

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg

Direktor: Prof. Dr. R. Siegert

**Trimethoprimresistenz
bei Enterobacteriaceae
und Staphylococcus aureus**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg**

vorgelegt von

ERNST-GÜNTHER GENSCH

aus Bad Sooden Allendorf

Marburg 1975

Druck: Mauersberger, Marburg

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg

Direktor: Prof. Dr. R. Siegert

**Trimethoprimresistenz
bei Enterobacteriaceae
und Staphylococcus aureus**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

ERNST-GÜNTHER GENSCH

aus Bad Sooden Allendorf

Marburg 1975

Druck: Mauersberger, Marburg



Angenommen von dem Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am: 16. Dez. 1975

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. G. Depen

Referent: Prof. Dr. W. Mannheim

Korreferent: Prof. Dr. J. Portig

Inhaltsverzeichnis

	Seite
EINLEITUNG	1
I. Begründung der vorliegenden Arbeit	1
II. Definition der untersuchten Keimgruppen	2
a) Enterobacteriaceae	2
b) Staphylococcus aureus	2
III. Klinische Bedeutung dieser Keime	3
IV. Die gegenwärtigen Vorstellungen über Resistenzeigenschaften und R-Infektion von Bakterien	3
a) Historische Entwicklung der Vorstellungen über die Resistenz von Mikroorganismen gegenüber Chemotherapeutika	3
b) R-Infektion bei den <u>Enterobacteriaceae</u>	4
c) Resistenztransfer bei den <u>Micrococcaceae</u>	8
V. Das therapeutische Konzept der Verwendung von Trimethoprim als Chemotherapeutikum	9
a) Die Entwicklung von Bakterienfolatreduktase-Hemmern und erste therapeutische Anwendungsgebiete einer Trimethoprim-Sulfamethoxazol-Kombination	9
b) Charakteristika von Trimethoprim und Sulfamethoxazol und deren Wirkungsweise im Folatstoffwechsel der Bakterien	10
c) Möglichkeiten die Trimethoprimwirkung zu umgehen	14

VI. Motivation der vorliegenden Arbeit	17
--	----

MATERIAL UND METHODEN

I. Mikroorganismen	17
a) Referenzstämme	17
b) Kulturen aus klinischem Material	17
II. Stammhaltung	17
III. Nährmedien	18
IV. Hemmstoffe	20
V. Testblättchen	21
VI. Sensibilitätsprüfung	22
VII. Nachweis des Trimethoprimeffektes auf die turbidimetrische Wachstumskurve	23
a) Herstellung von Vorkulturen und Kontrollpopulationen	23
b) Herstellung einer Trimethoprim- Stammlösung in Trypticase Soy Broth	23
c) Auswahl optisch einwandfreier Röhrchen	23
d) Herstellung von Verdünnungsreihen	24
e) Beimpfung	24
VIII. Bestimmung der 50 %-igen Hemmkonzentrationen (HK_{50}) in Trypticase Soy Broth	25
IX. Untersuchungen im Gradienteninkubator	25
a) Aufbau und Eichung des Gradienten- inkubators	25
b) Herstellung verschiedener Kulturansätze	26

X. Bestimmung des Spontanverlusts von Resistenz- eigenschaften bei 30°C und bei 45°C	27
XI. Prüfung der Elimination durch Ethidium- Bromid-Behandlung (EB)	27
XII. Lederberg-Stempeltechnik-Verfahren	29
XIII. Übertragungsversuche der TMP-Resistenz in Mischkulturen	29
RESULTATE	31
I. Häufigkeit der Trimethoprim-Resistenz bei <u>Enterobacteriaceae</u> und <u>S. aureus</u> aus klinischem Material im Agar-Diffusions- test von 1970 bis 1972	31
II. Die Wirkung der Trimethoprim-Sulfametho- xazol-Kombination im Agardiffusionstest	33
III. Die Trimethoprimwirkung auf das Wachstum von <u>Enterobacteriaceae</u> und <u>S. aureus</u> in flüssigen Medien	34
a) Effekt von Trimethoprim auf die turbidimetrische Wachstumskurve	34
b) Vergleich turbidimetrischer Wachs- tumskurven von im Blättchentest Trimethoprim-sensiblen und Trimetho- prim-resistenten Kulturen	34
c) Abhängigkeit der Trimethoprim- Hemmwirkung von der Zusammensetzung des Mediums	35
IV. HK ₅₀ bei Trimethoprim-sensiblen und Trimethoprim-resistenten Stämmen	36

a) Definition der Trimethoprim-Hemmwirkung anhand der HK_{50}	36
b) HK_{50} -Werte Trimethoprim-sensibler und Trimethoprim-resistenter Stämme	37
c) Vergleich zwischen der Trimethoprim-Wirkung auf die turbidimetrische Wachstumskurve und der HK_{50} von Trimethoprim in den verschiedenen Medien	38
V. Wachstumsabhängigkeit des Stammes <u>E. coli</u> 38954 von verschiedenen Temperaturen und Trimethoprimkonzentrationen	
a) Allgemeine Betrachtung der turbidimetrischen Wachstumskurven bei unterschiedlicher Bebrütungstemperatur	38
b) Verlängerung der Latenzphase	39
c) Verminderung der Wachstumsraten	39
d) Verminderung der Kulturerträge	40
e) HK_{50} in Abhängigkeit von der Bebrütungstemperatur	40
VI. Untersuchungen zur Genetik der Trimethoprimresistenz	
a) Spontanverlust der Trimethoprimresistenz	41
b) Elimination der Trimethoprimresistenz durch Ethidium-Bromid-Behandlung	42
c) Übertragung der Trimethoprimresistenz in Mischkulturen	43

DISKUSSION

I. Trimethoprimresistenz im Blättchentest	45
a) Verbreitung bei <u>Enterobacteriaceae</u> und <u>S. aureus</u>	45
b) Beziehung zwischen Sulfonamid- und Trimethoprimresistenz	47

II. Einfluß des Nährmediums auf die Sensibilitätsprüfung	48
a) Antagonisten der Trimethoprim-Hemmwirkung	48
b) Sulfonamid-Antagonisten	49
c) Biochemische Basis des Trimethoprim-antagonismus	50
d) Die Eignung verschiedener Medien zur Feststellung der Trimethoprim-hemmwirkung	51
e) Bedeutung von Trimethoprim-Antagonisten in vivo	52
III. Diffusion und Löslichkeit von Trimethoprim und Sulfamethoxazol	53
IV. Synergismus von Trimethoprim und Sulfamethoxazol	54
a) Hemmhofvergrößerungen im Blättchentest	54
b) Häufigkeit der Resistenz gegenüber der Trimethoprim/Sulfamethoxazol-Kombination im Blättchentest	55
c) Potenzierungseffekt in flüssigen Medien	56
V. Therapieempfehlung aufgrund der Sensibilitätsprüfungen in vitro	57
VI. Trimethoprimwirkung in flüssigen Medien	60
a) Einfluß von Trimethoprim auf das Kulturverhalten	60
b) Einfluß der Medienzusammensetzung auf den Trimethoprimeffekt	60
VII. Bedeutung der HK_{50} -Werte	61

VIII. Temperatureinfluß auf die Trimethoprim-	
Hemmwirkung	62
a) Latenz-Phase	62
b) Wachstumsraten	62
c) Kulturerträge	62
d) HK_{50} -Werte	63
e) Kulturverhalten	63
IX. Genetik der Trimethoprimresistenz	63
a) Lokalisation der Trimethoprim-	
Resistenzdeterminante	63
b) Eliminationsuntersuchungen	64
1. Möglichkeiten zur Eliminierung	
eines R-Faktors	64
2. Gegenüberstellung von Eliminations-	
ergebnissen mit Ethidium-Bromid	65
3. Dynamik von Elimination und Re-	
infektion der Trimethoprim-	
Resistenzgene	66
X. Übertragungsversuche	67
ZUSAMMENFASSUNG	71
TABELLEN	74
ABBILDUNGEN	92
LITERATUR	

Abkürzungsverzeichnis

AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adosintriphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTMP	Deoxyridinthymidinmonophosphat
DUMP	Deoxyuridinmonophosphat
DST	Diagnostic Sensivity Test (siehe Oxoid-Manual 1965 3. Edition)
EB	Ethidium-Bromid
ETM	Ethidium-Bromid-TSB-Gemisch
G	Sulfonamide
GI	Gradienteninkubator
HK ₅₀	Hemmstoffkonzentration, die 50 % einer lebenden Bateriaenkultur zu hemmen vermag
MH	Mueller-Hinton
MHA	Mueller-Hinton-Agar
MHB	Mueller-Hinton-Broth
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MIC	Minimal-inhibition-concentration
p-AB	para-Aminobenzoesäure
RNA	Ribonucleinsäure
SMZ	Sulfamethoxazol
SXT	SMZ/TMP-Gemisch auf den Sensibilitäts-testblättchen
TMP	Trimethoprim
TSA	Trypticase Soy Agar
TSB	Trypticase Soy Broth
UV	Ultraviolett
WK	Wachstumskurve
ml	Milliliter
/ μ g	10^{-6} Gramm

E I N L E I T U N G

Begründung der vorliegenden Arbeit.

Seitdem antibakterielle Chemotherapeutika zur Behandlung von Infektionen benutzt werden, sieht sich vor allem der Kliniker häufig vor das Problem gestellt, daß ein Antibiotikum, das gestern noch wirkte, plötzlich unwirksam geworden ist. Die Sensibilitätsprüfung ergibt, daß Vertreter einer vormals empfindlichen Species unter der Therapie gegen das verwendete Antibiotikum resistent geworden sind. Dieses Phänomen ist praktisch bei allen bisher verwendeten Antibiotika bekannt, wobei die Entstehung der Resistenz und deren Häufigkeit freilich einer Vielzahl verschiedener Mechanismen und Ursachen unterliegt. Auf Grund dessen werden in den letzten 2 1/2 Jahrzehnten große Anstrengungen unternommen, die Resistenzentstehung zu verhindern oder möglichst lange hinauszuzögern. Das Spektrum der immer wieder neu- und weiterentwickelten Antibiotika wächst ständig, vor allem, um sog. Problemkeime, aber auch alle anderen pathogenen Mikroorganismen therapeutisch zu treffen.

In diesem Bestreben wurden auch Versuche unternommen, Antibiotika mit verschiedenen Wirkungsmechanismen fest zu kombinieren, in der Erwartung, mit geringeren Einzeldosen eher den Zelltod erreichen zu können. Nachdem sich jedoch Kombinationspräparate mit fixen Substanzkonzentrationen für eine erfolgreichere antimikrobielle Chemotherapie als ungeeignet erwiesen - und von der WHO 1962 abgelehnt wurden (vgl. auch GALLIEN 1971) - ist seit dem Ende der sechziger Jahre erneut ein Kombinationspräparat unter den Namen Septrin und Eusaprim in der klinischen Erprobung. Gegen diese Kombination aus TMP und SMZ sind indessen auch schon resistente Keime isoliert worden, so daß es für den weiteren therapeutischen

Einsatz von Wichtigkeit ist, in welchem Ausmaß und mit welcher Geschwindigkeit sich die Resistenz, vor allem gegen die in den Präparaten verwendete neue Substanz Trimethoprim, entwickelt. Von besonderer Bedeutung erscheinen in diesem Zusammenhang die großen Gruppen der Enterobacteriaceae und Micrococcaceae, die in der vorliegenden Arbeit für die Untersuchungen verwendet wurden.

Definition der untersuchten Keimgruppen.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden Bakterien aus den Familien der Enterobacteriaceae und Micrococcaceae verwendet.

Enterobacteriaceae sind nichtsporenbildende, teils peritrich begeißelte, fermentative, Oxidase-negative, gramnegative Stäbchenbakterien von 0,5-1,5 μ m Dicke und 2-4 μ m Länge. Die Klassifizierung wird heute nach dem bekannten Schema von KAUFFMANN (1966) vorgenommen.

Die Spezies Staphylococcus aureus aus der Familie der Micrococcaceae faßt man als pyogene, fakultativ anaerobe, fermentative, grampositive, kugelige, in Haufen gelagerte, ca. 0,8 μ m im Durchmesser große Kokken zusammen, die u. a. folgende wichtige Pathogenitätsmerkmale aufweisen:

1. Sie sind Koagulase-positiv, d. h. sie bilden ein Enzym, das menschliches Plasma zum Gerinnen bringt.
2. Sie bilden alpha-Lysin, ein Haemolysin.
3. Sie bilden Nuklease.
4. Sie bilden Leukozidin.
5. Sie bilden Hyaluronidase.

Klinisch bedeutsam sind praktisch nur die Koagulase-positiven Staphylococcus aureus; etwa 99% aller pyogenen Staphylokokken sind Koagulase-positiv.

Klinische Bedeutung dieser Keime.

Die untersuchten Enterobacteriaceae haben ihre klinische Bedeutung vorwiegend als Colon-Normalflora, als Erreger opportunistischer Infektionen des Dünndarms, sowie als Erreger von Infektionen des Urogenitaltraktes, der Atemwege, von Septicaemien und Wundinfekten; S. aureus vorwiegend bei Pyodermien, Furunkeln, Abszessen, Follikulitiden, Wundinfektionen, metastasierender Sepsis, Mastitis puerperalis, Osteomyelitis und Infektionen des Nasen-Rachen-Raumes.

Die gegenwärtigen Vorstellungen über Resistenzeigenschaften und R-Infektion von Bakterien.

Historische Entwicklung der Vorstellungen über die Resistenz von Microorganismen gegenüber Chemotherapeutika.

PAUL EHRLICH beschrieb schon 1907 eine protozide Aktivität von p-rosalin gegenüber Trypanosoma brucei. Noch im gleichen Jahr konnte er zeigen, daß nach wiederholter Behandlung mit p-rosalin dieses Protozoon Resistenz gegen diese Substanz entwickelt hatte (FRANKE u. REEHL 1907).

1928 stellte FLEMING fest, daß der Schimmelpilz Penicillium notatum, der infolge Luftverunreinigung auf einem Nährboden gewachsen war, die Vermehrung von Staphylocokken hemmte. Systematische Untersuchungen um CHAIN et al. (1939) führten schließlich zur Gewinnung und Darstellung des Antibiotikums Penicillin, das 1940 erstmals in die Therapie bakterieller Infektionen eingeführt wurde (KEEFER 1954). Nachdem schon seit 1939 Resistenz gegen Sulfonamide durch Mutation bei Prokaryonten bekannt war (LURIA u. DELBRÜCK 1943), konnten ABRAHAM et al. 1941 bakterielle Resistenz gegen Penicillin nachweisen.

Die Entwicklung und Anwendung einer Vielzahl von Antibiotika ließ das Phänomen der Resistenzentstehung wiederholt auftreten, so daß man annehmen mußte, die Behandlung eines Mikroorganismus mit einem Antibiotikum induziert im Wiederholungsfalle eine Resistenz gegen dasselbe.

Man fand nun zunächst, daß unter etwa 10^9 - 10^{11} Coli-bakterien ein Keim ist, der durch chromosomale Mutation gegen ein Antibiotikum z. B. Streptomycin resistent ist (nach LEBEK 1972). Wirkt nun Streptomycin auf diese Population ein, dann werden die empfindlichen Keime abgetötet und die resistenten vermehren sich ungehemmt. Dies nennt man die sekundär erworbene chromosomale Resistenz durch Selektion.

Daneben kennt man die sekundär erworbene extrachromosomale Resistenz, die als die vorherrschende Form der klinisch bedeutsamen Resistenz der gramnegativen Bakterien und S. aureus anerkannt ist (LEBEK 1972). Sie wurde durch das Auftreten von mehrfachresistenten Shigellen 1957 in Japan gefunden (AKIBA 1959). Die Isolierung mehrfach-resistenter Colibakterien erfolgte 1959 durch MATSUYAMA et al.

AKIBA et al. (1961) und MITSUHASHI et al. (1960 u. 1961) gelang Anfang der sechziger Jahre die Übertragung der Mehrfachresistenz in Japan, ebenso wie DATTA 1962 in England und LEBEK 1963 in Deutschland.

Im Gegensatz dazu versteht man unter wildtypischer, primärer Resistenz die Wirkungslücke eines Antibiotikums, die durch eine genetisch fixierte Spezieseseigenschaft der Keime repräsentiert wird (LEBEK 1972).

R-Infektion bei den Enterobacteriaceae.

Der von MITSUHASHI et al. 1960 eingeführte Terminus des R-Faktors für "infektiöse Resistenz" wurde auf dem Kongress

für Bakteriengenetik 1962 in Japan allgemein anerkannt, ebenso auch die Begriffe der "R-Infektion" für die Übertragung von R-Faktoren durch Zellkontakt und "R-Kreuzung" für die durch R-Faktoren verursachte Übertragung chromosomaler Gene- auch F-Duktion genannt-(nach LEBEK 1969). Neben der R-Infektion durch Konjugation ist bei den Enterobacteriaceae auch die Übertragung von Resistenzeigenschaften durch Phagentransduktion bekannt (MEYNELL u. LAWN 1968). Seitdem wird ein Erreger als resistent betrachtet, wenn derjenige Chemotherapeutikumspegel, der in vivo erreichbar ist (Serumtiter), die Vermehrung des Mikroorganismus in vitro nicht mehr zu hemmen vermag.

Nach FALKOW et al. (1965) und ROWND et al. (1966) besteht ein R-Faktor aus einem ringförmigen, extrachromosomalen DNA-Doppelstrang, der etwa 50 Gene beherbergen kann; u. a. auch Resistenzdeterminanten gegen Antibiotika. Anfänglich unterschied man bei den R-Determinanten tragenden R-Faktoren zwischen Plasmiden und Episomen, wobei nach LEDERBERG et al. (1952) ein Plasmid eine nicht integrierbare, extrachromosomale Bakterien-DNA darstellt, während es sich bei einem Episom nach JAKOB u. WOLLMANN (1961) um eine integrierbare, extrachromosomale DNA handelt. Da sich aber auch Plasmide als in das Bakterienchromosom integrierbar erwiesen (MEYNELL u. DATTA 1965), ist diese Unterscheidung heute nicht mehr aufrecht zu erhalten, weshalb wir von einem R-Faktor sprechen. Die wichtigsten Determinanten auf dem R-Faktor sind:

1. Der von WATANABE u. FUKUSAWA (1961) als RTF eingeführte Determinantenkomplex. Dieser ist für die Reduplikation des R-Faktors innerhalb der Bacterienzelle unabhängig von der Keimvermehrung verantwortlich. Daneben ist die Bildung eines Sexualpilus auf ihm kodiert. Schließlich enthält er gewöhnlich noch einen Repressor (f_i = fertility inhibition), der seine eigenen Funktionen und auch die eines zugleich anwesenden F-Faktors um den Faktor 100-1000 unterdrückt. F-Faktoren sind als Sex-Faktoren von Coli-Bakterien bekannt (MAYES 1964;

JAKOB u. WOLLMAN 1961). Sie können sich an das Chromosom der Wirtszelle anheften, den Ringverband sprengen und das Chromosom in Teilen oder als Ganzes nach einer Konjugation mit einer Nachbarzelle in diese transferieren. Man kennt zwei F-Faktorenzustände, wobei man zwischen Hfr bei der F-Duktion und F^+ bei der R-Infektion syn. F-Infektion unterscheidet. Die Enterobacteriaceae kommen aber als Wildstämme fast ausschließlich als F^- oder F^+ Klone vor, und in F^+ Populationen werden Hfr-Varianten nur in einer Häufigkeit von ca. 10^{-4} beobachtet (LEBEK 1969 u. 1972). Unterdrückt nun ein RTF die Funktion des F-Faktors, so ist er fi^+ , im anderen Fall fi^- . Der Repressor ist dafür verantwortlich zu machen, daß die Übertragungsfrequenz von R-Faktoren nur etwa 10^{-3} - 10^{-6} beträgt. Gelangt ein R-Faktor von einer Wirtszelle in eine Akzeptorzelle, so nennt man diesen Vorgang "R-Infektion".

Es ist bis heute sicher bekannt, daß bei einer R-Infektion nur ein Strang der doppelsträngigen DNA des R-Faktors in die Akzeptorzelle übertritt und dann bei beiden Einzelsträngen wieder identische Reduplikation eintritt (MEYNELL u. DATTA 1965). Für das Zustandekommen einer R-Infektion sind besondere Kompatibilitäten zwischen den Oberflächen der beiden Partnerkeime erforderlich. Nicht jeder R-Faktor kann in jede Enterobacteriaceae-Zelle transferieren und nicht jede Enterobacteriaceae-Zelle kann jeden R-Faktor aufnehmen. So ist z. B. eine R-Infektion nur möglich, wenn die Donator-Zelle F^+ ist, da es sonst nicht zur Konjugation zweier Zellen kommt. Der Mechanismus der R-Infektion ist gegen pH-Änderungen wenig empfindlich, denn sie kann zwischen pH 5,5-8,0 erfolgen. Das pH-Optimum liegt jedoch zwischen pH 7,0-8,0. R-Infektionen finden bei Temperaturen zwischen 22°C - 40°C statt. Vermehrung der Keime ist zur R-Infektion nicht notwendig; Energiezufuhr braucht nur der Donator, die er aber aus seinen Reserveenergiestoffen decken kann (LEBEK 1972).

2. Die Resistenzdeterminanten machen zwar nur einen kleinen Teil auf dem R-Faktor aus, sind aber für die antibiotische Therapie von großer Bedeutung. Sie sind nicht nur für die Erscheinung der Resistenz gegen ein bestimmtes Antibiotikum, sondern auch für die Höhe der Resistenz verantwortlich. Nach LEBEK sind bis 1972 Resistenzdeterminanten in R-Faktoren gegen folgende Antibiotika nachgewiesen worden:

Tetracyclin, Chloramphenicol, Streptomycin, Kanamycin, Neomycin, Ampicillin, Gentamycin, Sulfonamide, Furadantin und Trimethoprim.

NOWICK et al. (1969) wiesen als Träger der Determinanten für Penicillasebildung in S. aureus R-Faktoren nach. Die Übertragung der entsprechenden Resistenzeigenschaften geschieht im allgemeinen en bloc. Selten werden jedoch auch Resistenzeigenschaften einzeln übertragen, wenn sich in der Population verschiedene R-Faktoren befinden.

Während sowohl bei den chromosomal zur Antibiotika-resistenz mutierten Keimen als auch bei den R-Faktor infizierten Keimen die genetische Determination in einer veränderten DNA besteht, wird der Phänotyp dieser Veränderung in der Expression der Resistenz dargestellt, deren Ausdruck von einer Zellteilung unabhängig ist und schon 10-20 Minuten post infectionem nachweisbar ist (LEBEK 1969). Dennoch lassen sich vor allem bei der durch R-Faktoren hervorgerufenen Resistenz verschiedene Resistenzmechanismen unterscheiden. So kennt man einerseits die enzymatische Inaktivierung eines Antibiotikums, wie beispielsweise beim Ampicillin (ANDERSON u. DATTA 1965), beim Chloramphenicol (MITSUHASHI et al. 1967), beim Kanamycin und beim Streptomycin (LEBEK 1972), andererseits die Hemmung der Permeabilität einer Bakterienwand. Dies ist u. a. bei der infektiösen Sulfonamidresistenz bekannt (PATO et al. 1963). Daneben kennt man bei der Sulfonamid-resistenz noch sog. "veränderte Enzymsysteme", wo sich das Antibiotikum aufgrund fehlender oder stark einge-

schränkter Affinität nicht effektiv mit den entsprechenden Enzymen verbinden kann, die bei der para-Aminobezoesäureutilisation von Bedeutung sind. Auch von einer Sulfonamidresistenz aufgrund einer p-AB-Überproduktion wurde schon 1943 von LURIA u. DELBRÜCK bei S. aureus Stämmen berichtet.

Der Verlust von R-Faktoren oder nur Teilen davon, kann sowohl spontan erfolgen als auch durch den Einfluß verschiedener Maßnahmen induziert werden. So wird der Verlust z. B. durch ungünstige Vermehrungsverhältnisse und häufige Keimpassagen ebenso begünstigt wie durch UV-Bestrahlung oder Einwirkung von DNA-Giften, wie z. B. Akridinderivate oder Ethidium-Bromid.

Resistenztransfer bei den Micrococcaceae.

Im Gegensatz zur R-Infektion bei Enterobacteriaceae ist bei Mikroorganismen mit grampositiven Wänden keine Zellkonjugation bekannt. Damit fehlt den R-Faktoren der S. aureus die Information für die eigene genetische Übertragung auf die Nachbarzelle. R-Faktoren können in der S. aureus-Zelle solitär oder multipel auftreten und dadurch zu unterschiedlichen Resistenzmustern führen; sie können jedoch durch Phagentransduktion auf andere Zellen übertragen werden (nach LEBEK 1972).

Das therapeutische Konzept der Verwendung von
Trimethoprim als Chemotherapeutikum.

Die Entwicklung von Bakterienfolatreduktase-Hemmern
und erste therapeutische Anwendungsgebiete einer
Trimethoprim-Sulfamethoxazol-Kombination.

HITCHINGS et al. (1948) konnten zeigen, daß 2,4-Diamino-pyridin und Derivate die Bakterienfolatreduktase hemmen. HITCHINGS (1961 u. 1962) und HITCHINGS et al. (1966) zeigten, daß in vitro die Wirkung von Sulfonamiden, durch ihre gemeinsame Anwendung mit Hemmstoffen der bakteriellen Folatreduktase, gesteigert werden kann. Eine erfolgreiche Therapie mit solchen Kombinationspräparaten gegen Protozoenerkrankungen ist von mehreren Autoren beschrieben worden (EYLES u. COLEMAN 1953; LUX 1954; FRENKEL u. HITCHINGS 1957; HITCHINGS 1960; CLARKE 1962).

Nachdem zwischen 1953 und 1957 kurze klinische Untersuchungen mit 2,4-diamino-5-(5-bromo-3,4-dimethoxybenzyl)-pyrimidin, mit 2,4-diamino-5-(3-methoxy-4-propoxybenzyl)-pyrimidin und 2,4-diamino-5-(4-butoxy-3-methoxybenzyl)-pyrimidin wegen einiger Unverträglichkeiten nicht erfolgreich verlaufen waren, konnte bei Versuchen mit Affen unter Verwendung von 2,4-diamino-5-(3,4,5-trimethoxybenzyl)-pyrimidin gezeigt werden, daß die Nebenwirkungen nicht auftraten. - Die Entwicklung dieser Substanz geht auf FALCO, DU BREUIL und HITCHINGS (1951) zurück; sie ist mit dem heute benutzten Trimethoprim (TMP) identisch. - Es wurde sogar festgestellt, daß Trimethoprim eine höhere antibakterielle Aktivität besitzt, als dies bei den drei zunächst benutzten Substanzen der Fall war. Daraufhin wurde - sowohl in den Wellcome Research Laboratories in England als auch bei Hoffmann-La Roche (Grenzach) unabhängig voneinander - nach einem Kombinationspräparat aus Trimethoprim und einem geeigneten Sulfonamid gesucht. Das Sulfonamid mußte den gleichen Resorptions- und Exkretionsbedingungen und der gleichen Organverteilung wie das

Trimethoprim unterliegen (HUNTER 1970). Hauptsächlich mußte jedoch die antibakterielle Wirkung zusammen mit Trimethoprim optimal potenziert werden. Sulfamethoxazol (SMZ) erwies sich am geeignetsten, so daß 1962 ein Kombinationspräparat aus Trimethoprim und Sulfamethoxazol synthetisiert wurde und unter den Namen Septrin, bzw. Ro-6-2580 zur klinischen Erprobung ausgegeben wurde. NOALL et al. behandelten 1962 erstmals erfolgreich einen Patienten mit einer Proteus-Septicämie. 1964 wurde ein ähnlicher Fall von COOPER und WALD beschrieben. CSOŃSKA und KNIGHT verwendeten das Präparat 1967 erfolgreich gegen Gonorrhoe. Ebenfalls 1967 berichten DREW et al. von dem Gebrauch des Kombinationspräparates bei Bronchialinfektionen, und auch SOURRANDER und WERNER hatten im gleichen Jahr Erfolg mit der Therapie von Harnwegsinfekten. 1968 beschreiben DARRELL et al. die Wirkung bei chronischen Bronchitiden und 1969 berichten MORZARIA et al. von der erfolgreichen Behandlung einer neonatalen Meningitis.

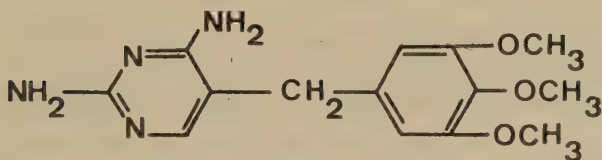
Charakteristika von Trimethoprim und Sulfamethoxazol und deren Wirkungsweise im Folatstoffwechsel der Bakterien.

BUSHBY und HITCHINGS (1968) beschreiben folgende Eigenschaften des Trimethoprims:

1. Trimethoprim potenziert die therapeutisch antibakterielle Wirkung von Sulfonamiden um einen angemessenen Wert. Es produziert ein breites antibakterielles Spektrum, das auch Problemkeime wie Proteus und Bordetella-Spezies erfaßt.
2. Trimethoprim besitzt keine sehr wirkungsvollen pharmkodynamischen Aktivitäten, d. h. es konnten keine mydriatischen, analgetischen oder sedierenden Wirkungen bei der Gabe von 5 mg/kg s. c. in Mäusen beobachtet werden ebenso wenig wie Wirkungen auf die sympathischen oder parasympathischen Funktionen an betäubten Katzen. Die LD₅₀ für Mäuse lag bei ca. 200 mg/kg.

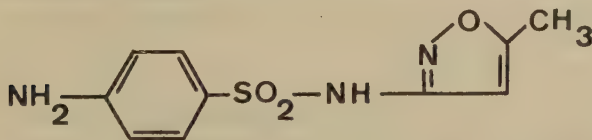
3. Trimethoprim wird bei oraler Gabe vollständig resorbiert.
4. Trimethoprim zeigt hohe Bindungsfähigkeit zu Serumproteinen, wenngleich die Konzentrationen im Gewebe mehrere Male höher sind als im Plasma. Die höchsten Werte wurden in der Lunge und in der Niere festgestellt, aber auch mit der Galle wird ein beträchtlicher Teil sezerniert.
5. Die physiologische Halbwertszeit beträgt 13,25 Std.; die Harnkonzentration ist 100 x höher als im Serum. Trimethoprim als kristalline Substanz ist farblos, geruchlos und schmeckt leicht bitter. Die Summenformel lautet: $C_{14}H_{18}N_4O_3$

Die Strukturformel:



Das Molekulargewicht beträgt 290,3g; der Schmelzpunkt liegt bei 199°C. TMP ist in warmem Wasser gut löslich und bleibt im Autoklaven bei 120°C bis 20 Min. stabil.

Sulfamethoxazol ist chemisch 5-Methyl-3-sulfanilamido-isoxazol mit der Summenformel $C_{10}H_{11}N_3O_3S$ und folgender Strukturformel:



Seit Oktober 1968 ist das Kombinationspräparat Trimethoprim/Sulfamethoxazol in England im Handel, seit 1969 in Deutschland. Eine Tablette enthält 80mg Trimethoprim und 400mg Sulfamethoxazol; also ein TMP/SMZ-Verhältnis von 1:5.

Das Wirkungsspektrum der Kombination wird von folgenden Autoren gemeinsam angegeben: BUSHBY u. BARNETT (1967); GARROD u. WATERWORTH (1967); BUSHBY u. HITCHINGS (1968); DARRELL et al. (1968) und BÜHNI (1969).

Es umfaßt demnach folgende Spezies:

Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Diplococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis, Haemophilus influenza, Klebsiella sp., Aerobacter aerogenes, Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Shigella sonnei, Proteus mirabilis, P. vulgaris, Streptococcus agalactiae, Erysipelotrix rhusopathiae, Corenybacterium diphteriae, Salmonella typhi, S. enteritidis, Shigella dysenteriae, S. flexneri, S. boydii, Vibrio cholerae, Pasteurella septica, pseudotuberculosis et haemolytica, Proteus rettgeri, P.morganii, Moraxella lacunata, Clostridium perfringens, Bordetella pertussis und Neisseria gonorrhoeae.

Die antibakterielle Wirkung der Kombination von TMP und SMZ beruht auf dem Eingreifen beider Substanzen in den Folsäurestoffwechsel der Bakterien. Im Gegensatz zum Menschen, der Folsäure mit der Nahrung aufnehmen muß, ist es einigen Bakterien möglich, Dihydrofolsäure (FAH_2) selbst zu synthetisieren. Sie benötigen dazu die drei Hauptbestandteile der Folsäure, das Dihydropteridin, die p-Aminobenzoessäure und Glutaminsäure.

Pteridine sind Farbstoffe, die z. B. im Schmetterlingsflügel vorkommen, p-Aminobenzoessäure ist Wachstumsfaktor mancher Mikroorganismen - auch Vitamin H bezeichnet - und Glutaminsäure ist eine ubiquitär vorkommende Aminosäure (vgl. hierzu Abb. 1).

Die antibakterielle Wirkung von Sulfonamiden besteht nun in dem irrtümlichen Einbau des Sulfonamid-Moleküls anstatt der p-Aminobenzoessäure in das Folsäuremolekül. Man spricht hierbei von einer kompetitiven Hemmung, die in einer Bakterienpopulation eine Bakteriostase hervorruft. Die dadurch entstehende "falsche Tetrahydrofolsäure (FAH_4)" ruft schließlich einen funktionellen Folsäuremangel hervor, der weiteres Wachstum verhindert (DAVIES u. MAAS 1952; PATO u. BROWN 1963).

Trimethoprim hemmt den nächsten Schritt des Folsäurestoffwechsels. Da die linke Hälfte der Strukturformel dem Aminopterinstoff eines Folatmoleküls ähnlich ist, wirkt es als Pseudosubstrat für die Folatreduktase, die Dihydrofolsäure (FAH_2) in die metabolisch aktive Form der N^{10} -Formyltetrahydrofolsäure (FAH_4) reduzieren soll. Die Reaktion beruht auf der katalysierten Übertragung von NADP-H-Wasserstoff auf FAH_2 (BURCHALL 1969). Durch die unterschiedlichen Bindungsmöglichkeiten des TMP zur Dihydrofolatreduktase können sogar Affinitätsunterschiede bei gleichen Stämmen auftreten (HITCHINGS 1970). Die aktivierte Tetrahydrofolsäure - auch als Coenzym F bezeichnet - wird für den Transfer von Hydroxymethylgruppen (aktivierter Formaldehyd) und Formylgruppen (aktivierte Ameisensäure) benötigt. Mit diesen C_1 -Bruchstücken werden dann Purin und Pyrimidinsbasen (Adenin, Guanin, Cytosin, Uracil und Thymin) synthetisiert, die ihrerseits wieder Bestandteile der Nucleinsäuren sind. Von der Existenz der Nucleinsäuren hängt die Synthese der zelleigenen Proteine ab.

Vor allem Thymin entsteht vermittels einer Reaktion aus FAH_4 und Deoxyuridinmonophosphat, dessen Methylierung durch die Thymidylatsynthetase katalysiert wird. Dabei wird fortlaufend FAH_4 zu FAH_2 oxidiert, so daß eine ständige Reduktion von FAH_2 in FAH_4 nötig ist, um ein angemessenes Reservoir dieses lebenswichtigen Cofaktors aufrecht zu erhalten.

Die Verabreichung von Sulfonamiden allein hemmt oder stoppt die Produktion von funktionell brauchbarer FAH_2 , aber die bestehenden Pools von FAH_4 können das Zellwachstum für einige Generationen weiter unterstützen. - Bei E. coli besteht bei der Behandlung mit Sulfonamiden eine konzentrationsunabhängige Verzögerungsphase bis zum Wirkungseintritt von 5 Generationen (KOHN und HARRIS 1941). Beim TMP ist die Verzögerungsphase sehr kurz (SEYDEL et al. 1972). -

Das Hinzufügen von TMP, das FAH_2 an der Dihydrofolatreduktase kompetitiv verdrängt, entlastet die FAH_4 -Pools in Abhängigkeit von der Aktivität der Thymidilatsynthetase sehr viel schneller (BURCHELL; HITCHINGS 1973). Dadurch wird indirekt die Thymidilatsynthetase mitgehremmt, und der Wuchs von Thy^+ -Zellen, d. h. Zellen, die ihr eigenes Thymin synthetisieren können, bei Zuführung von exogenem Thymin dennoch gehemmt (DALE u. GREENBERG; MIOVIC u. PIZER 1971). Außerdem ist bekannt, daß Organismen, die Thy^+ sind, exogenes Thymidin bzw. Thymin nur schwer aufnehmen (BUSHBY u. HITCHINGS 1968). Diese Zusammenhänge zeigt Abb. 2.

Man nennt diese stufenweise Blockade des Folsäurestoffwechsels Sequentialeffekt. Nach DARRELL et al. (1968), BUSHBY (1969) und LACEY et al. (1972) sollte die Möglichkeit einer Resistenzentstehung durch den Sequential-effekt auf ein Minimum reduziert sein. Die TMP/SMZ-Kombination wirkt schon in Konzentrationen bakterizid, bei denen die Einzelkomponenten nicht einmal bakterio-statisch wirken (BÖHNI 1969a; LINZENMEIER 1973; SEYDEL 1973). Über den Chemismus des TMP konnten weitere Beobachtungen gemacht werden. So zeigten Untersuchungen der WELLCOME LABORATORIES, daß ein Molekül TMP die Reduktion von 1000 Molekülen FAH_2 zu FAH_4 inhibieren kann. 1965 fanden BURCHALL und HITCHINGS, daß die Dihydrofolatreduktase der Bakterien sich in ihren physikalischchemischen Eigenschaften von dem entsprechenden Enzym der Säuger derart unterscheidet, daß die Affinität des TMP zur Säugetierdihydrofolatreduktase um 10^5 mal geringer ist.

Möglichkeiten, die Trimethoprimwirkung zu umgehen.

Neben der Abhängigkeit der TMP-Wirkung von der Einsaatdichte, der Wirkstoffkonzentration, Stickstoffquelle und Artspezifität (GALLIEN 1973) ist die Anwesenheit von Antagonisten in vivo und in vitro von Bedeutung. Die Möglichkeit, daß ein Mechanismus existiert, die TMP-Hemmung zu umgehen, wurde zunächst durch Versuche ange-

nommen, in denen gezeigt wurde, daß Thymidin in der Lage war, die Aktivität von Aminopterin entgegenzuwirken (KOCH u. BURCHALL 1971). Verschiedene Autoren haben bis heute festgestellt, daß die Hemmwirkung von TMP durch die Anwesenheit von Thymin, Thymidin, Thymidin-5-monophosphat, p-Aminobenzoessäure, RNA, Aminosäuren und Vitamin B₁₂ beeinflusst werden kann (vgl. S.49).

Die Hemmung hängt von der Aktivität der Thymidilatsynthetase ab, die bei der Gabe der entsprechenden Substanzen antagonisiert oder umgangen wird (MIOVIC u. PIZER 1971; DALE u. GREENBERG 1972; PINNEY u. SMITH 1973). Bei Thy⁻ E. coli Mutanten, d. h. Stämmen, die exogenes Thymin zum Wachstum benötigen, ist die Thymidilatsynthetase bzw. die FAH₂-Reduktase nicht aktiv, wodurch TMP keinen enzymatischen Angriffspunkt hat und daher nicht wirksam sein kann. Solche TMP-resistenten, thyminfordernden Mutanten sind nach TMP/SMZ-Therapie aus Harnwegsinfekten und Pus isoliert worden (PINNEY u. SMITH 1973). Diese Stämme sind dann primär TMP-resistent.

Motivation der vorliegenden Arbeit.

Mit dem therapeutischen Einsatz des Kombinationspräparates an den Universitätskliniken in Marburg wurde im diagnostischen Laboratorium des Hygiene-Institutes der Universität Marburg zunächst nur an ausgewählten Stämmen seit 1970 das Resistenzverhalten von einigen Enterobacteriaceae und S. aureus auf Trimethoprim geprüft. Dabei fiel im Jahre 1970 auf, daß einzelne Stämme TMP-resistent waren.

Die vorliegenden Untersuchungen hatten die Aufgabe festzustellen, wie hoch das TMP-Resistenzvorkommen in 1970 bei E. coli und S. aureus war, und ob es sich in den folgenden Jahren verändert hat.

Weiterhin sollte das quantitative TMP-Resistenzverhalten einiger Teststämme bestimmt werden.

Schließlich sollten Versuche, die TMP-Resistenz zu eliminieren und zu transferieren, die genetische Lokalisation der TMP-Resistenzdeterminante aufklären. Da TMP bei vielen Erregern in der im Kombinationspräparat angewandten, therapeutischen Dosis nur bakteriostatisch wirkt (BUSHBY u. BARNETT 1967; DARRELL et al. 1968), und dadurch bei vorliegender SMZ-Resistenz der potenzierende Effekt des Kombinationspräparates, d. h. die Bakterizidie entfällt, ist bei einer Landzeittherapie die Resistenzentstehung möglich.

- Schon 1969 benutzten DARRELL et al. und BUSHBY sog. "training cells" für ihre Untersuchungen mit TMP-resistenten Organismen; diese zunächst TMP-sensiblen Zellen waren unter dem Einfluß von steigenden, subinhibitorischen TMP-Konzentrationen kultiviert worden, woraufhin sie Resistenz gegen TMP zeigten. -

Wenn aber TMP-Resistenz vorliegt, so ist die potenzierende Wirkung des TMP auf SMZ in vitro nicht mehr gegeben (BÜHNI 1969, LEBEK u. WIEDEMER 1971) und das Präparat sinngemäß unwirksam. Aus diesem Grund sollen in der vorliegenden Untersuchung die TMP-Wirkungen im wesentlichen für sich allein analysiert werden.

M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

Mikroorganismen

Referenzstämme.

Als Referenzstämme wurden Keime aus der Stammsammlung des Laboratoriums für Bakterienphysiologie des Hygiene-Institutes verwendet. Ihre Herkunft und Eigenschaften sind aus der Tab. 1 ersichtlich.

Kulturen aus klinischem Material.

Alle weiteren in dieser Untersuchung verwendeten Keime entstammen Untersuchungsmaterial von Kliniken der Universität Marburg, Arztpraxen und Krankenhäusern Nordhessens, die zur bakteriologischen Untersuchung an das Untersuchungsamt eingesandt worden waren. Nach kultureller Isolierung, sowie biochemischer und gegebenenfalls serologischer Identifizierung, wurde die Sensibilität gegen antibakterielle Chemotherapeutika im Papierblättchentest bestimmt (Tab. 2). Zur Prüfung der Empfindlichkeit gegen Trimethoprim (TMP) wurde zunächst ein einzelnes Blättchen mit 1,25 µg/ml TMP der Firma Oxoid, Div. Oxo Ltd. London aufgelegt. Für die routinemäßigen Resistenzbestimmungen wurde DST-Agar, Oxoid, ab Januar 1972 der von der WHO empfohlene Mueller-Hinton Agar verwendet (ERICSEN u. SHERRIS 1971). Stämme, die um das TMP-Papierblättchen einen Hemmhof größer als 12 mm im Durchmesser zeigten, wurden als TMP-resistent bezeichnet und gesammelt.

Stammhaltung.

TMP-resistente Stämme aus der Familie der Enterobacteriaceae und von S. aureus wurden nochmals fraktioniert und auf Trypticase Soy Agar ausgesät. Von hier wurde eine

Einzelkolonie verimpft und die Subkultur bei $+4^{\circ}\text{C}$ gelagert. Vor dem Versuch wurde die Reinheit, Spezieszugehörigkeit und das Resistenzspektrum erneut geprüft; nach Beendigung der Untersuchungen wurden die benutzten Stämme lyophilisiert und in unter Vakuum zugeschmolzenen Ampullen bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Für die vorliegende Untersuchung wurden 31 E. coli, 6 Proteus, 5 Enterobacter, 7 Klebsiella, 1 Ps. aeruginosa und 6 S. aureus Stämme verwendet.

Nährmedien.

1. Trypticase Soy Broth (TSB) - Difco Laboratories, Michigan, USA.

Die Zusammensetzung in Gramm/Liter H_2O lautet:

Bacto-Tryptone (Pankreatic Digest of Casein USP)	17	g
Bacto Soytone (Soy Bean Peptone)	3	g
NaCl	5	g
Bacto-Dextrose	2,5	g
K_2HPO_4	2,5	g
pH 7,3 bei 25°C		

2. Mueller-Hinton Broth (MHB), OXOID DIV. OXO LTD. LONDON.

Beef Infusion of 300 g	
Casamino Acids Technical	17,5 g
Bacto Soluble Starch	1,5 g
pH 7,4 bei 25°C	

3. Ammoniumglucose-Medium nach KAUFFMANN (1954).

NaCl	5	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2	g
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1	g
K_2HPO_4	1	g
pH 7,3 bei 25°C		

1000 ml Mineralbasis wurden mit 25 ml 20%iger Dextrose (pos.) gemischt. Endkonzentration: 1025 ml 0,5%iges Ammoniumglucose-Nährmedium.

4. DST-Agar-OXOID CM 261 DIV. OXO LTD. LONDON.

Proteose Pepton (Oxoid L 46)	10,0 g
Kalbfleischextrakt (Trockensubstanz)	10,0 g
Dextrose	2,0 g
NaCl	3,0 g
Na ₂ PO ₄	2,0 g
Natriumacetat	1,0 g
Adeninsulfat	0,01g
Guaninhydrochlorid	0,01g
Uracil	0,01g
Xanthin	0,01g
Aneurin	0,00002g
Agar Nr. 1 (Oxoid L 11)	12,0 g
pH 7,4	

5. Mueller-Hinton Agar (MHA) - CM 337-OXOID DIV. OXO LTD. LONDON.

Beef infusion of 300 g	
Casein Hydrolysat (Oxoid L 41)	17,5 g
Starch	1,5 g
Agar Nr. 1 (Oxoid L 11)	17,0 g

6. Tryptic-Soy-Agar (TSA), Difco Laboratories, Michigan, USA.

Bacto Tryptone, Pancreatic Digest of	
Casein	15,0 g
Bacto Soytone, Soy Bean Peptone	5,0 g
NaCl	5,0 g
Bacto Agar	15,0 g
pH 7,3 bei 25°C	

7. Schrägagar-Stichagar

1 % Fleischpepton
0,5 % Fleischextrakt
0,4 % NaCl

0,2 % Na-Phosphat

2,0 % Fadenagar

pH 7,4-7,6

8. Der Blutagar ist ebenso zusammengesetzt wie 7.), jedoch unter Hinzufügen von 5-8% nativen, defibrierten Hammelblut.

9. Dem Kochblutagar ist 7% erwärmtes Hammelblut (20') hinzugefügt.

10. Thioglycolatmedium, Difco Laboratories, Michigan, USA.

Bacto Caston	15,0 g
Bacto Yeast Extrakt	5,0 g
Bacto Dextrose	5,5 g
NaCl	2,5 g
L-Cystine, Difco	0,5 g
Na-Thioglycolat	0,5 g
Bacto Agar	0,75g
Resazurin Certified	0,001g
pH 7,1 bei 25°C	

Alle Nährmedien werden 15 Minuten bei 1,1 atü = 121°C autoklaviert.

Hemmstoffe

Trimethoprim (TMP)

Als Hemmstoff wurde TMP in Reinsubstanz (Pulverform) der Deutschen Wellcome G.m.b.H. verwendet. Die kristalline Substanz ist leicht bitter und hat einen pK-Wert von 7,3. Sie ist farb- und geruchlos und bildet in Verbindung mit einer Reihe von Säuren stabile Salze. TMP ist wasserlöslich und bleibt im Autoklaven bei 120°C bis zu 20 Minuten stabil.

Ethidium-Bromid (EB)

Ethidium-Bromid ist chemisch ein 2,7-Diamino-10-äthyl-9-phenyl-phenantidumbromid mit der Summenformel $C_{21}H_{20}N_3Br$ und einem Molekulargewicht von $M = 394,3$ g. Es wurde die Substanz in Pulverform reinst. der Firma Serva, Feinbiochemica G.m.b.H. u. Co./KG., Heidelberg verwendet.

Testblättchen.

Zur Sensibilitätsprüfung wurden Multodisksterne von Bxoid Div. Oxo Ltd. London verwendet.

Code 3636 E

1. Penicillin G (1,5 IE)	P
2. Ampicillin (10/ug)	PN
3. Ciclacillin (20/ug)	CI
4. Cephalothin (15/ug)	KF
5. Tetracyclin (10/ug)	TE
6. Chloramphenicol (10/ug)	C
7. Sulfurazol (100/ug)	G
8. Trimethoprim (1,25/ug)	W

Code 3627

9. Cloxacillin (5/ug)	OB
10. Erythromycin (10/ug)	E
11. Lincomycin (2/ug)	MY
12. Fusidinsäure (10/ug)	FD
13. Novobiocin (5/ug)	NV

Code 3628

14. Carbenicillin (100/ug)	PY
15. Streptomycin (2/ug)	S

16. Kanamycin	(5/ μ g)	K
17. Colistin	(50/ μ g)	CS
18. Gentamycin	(10/ μ g)	CN
19. Nitrofurantoin	(50/ μ g)	F
20. Nalidixinsäure	(30/ μ g)	NA

Ebenfalls von der Firma Oxoid waren die verwendeten Einzeltestblättchen, die mit folgenden Substanzkonzentrationen imprägniert sind.

W: 1,25/ μ g/ml;	Trimethoprim
ROL: 23,75/ μ g/ml	Sulfamethoxazol
SXT: 25/ μ g/ml	Kombination TMP/SMZ

Anmerkung: Nach Einnahme einer handelsüblichen Dosis TMP/SMZ im Verhältnis 1:5, findet man im Blut und Liquor cerebrospinalis ein Konzentrationsverhältnis TMP/SMZ=1:20. Dieses Konzentrationsverhältnis hat sich am wirksamsten erwiesen, und selbst eine Konzentrationserhöhung einer der beiden Substanzen steigert nicht den Grad der Bakterizidie (GALLIEN 1971). Daher sind die Substanzkonzentrationen der Sensibilitätstestblättchen in vitro ebenfalls im Verhältnis TMP/SMZ=1:20 imprägniert.

Sensibilitätsprüfung.

Die Agarplatten wurden mit 0,5 ml Bakteriensuspension in Mineralbasis beimpft, mit ca. 10 ml Nährmedium gefüllt und nach Erstarren der Platten (ca. 15-20 Minuten) mit den wirkstoffhaltigen Blättchen beschickt. Die derart beschickten Platten wurden 20-30 Minuten zur Vordiffusion bei Zimmertemperatur belassen. Die Ablesung der Wuchshemmzonen erfolgte nach 18-24 Std. Inkubation bei 37°C.

Nachweis des Trimethoprim-Effekts auf die turbidimetrische Wachstumskurve.

Um zunächst zu erfahren in welchem Bereich die TMP-Hemmwirkung liegt und welches Ausmaß sie annimmt, wurde das Wachstum TMP-sensibler und TMP-resistenter E. coli-Stämme in TSB unter ansteigender TMP-Konzentration turbidimetrisch beobachtet.

Herstellung von Vorkulturen und Kontrollpopulationen.

Die Reinkulturen wurden hergestellt, indem vom Schrägagar eine Öse in Thioglykolatbouillion verimpft und 24 Std. bei 37°C inkubiert wurde. Danach wurde 24 Std. bei 37°C auf Blutagar fraktioniert. Von einem Klon der E. coli-Stämme FDA,38954 und 39188 wurde jeweils eine Vorkultur beimpft und auf Blutagar fraktioniert. Beides wurde 24 Std. bei 37°C inkubiert. Die Vorkulturen waren aus Röhrchen mit jeweils 5 ml TSB hergestellt worden. Die auf Blutagar fraktionierten Keime wurden als Kontrolle für Wachstumsform und Resistenzmuster verwendet.

Herstellung einer Trimethoprim-Stammlösung in Trypticase Soy Broth.

Eine Stammlösung von 1 mg TMP/ml in TSB wurde durch Rühren bei 50°C hergestellt und mittels Saugfiltration durch eine Glasfritte (Schott G 5m) sterilisiert.

Auswahl optisch einwandfreier Röhrchen -Kalibrieren-

Jenaer-Glas-Röhrchen wurden zunächst mit Chromschwefelsäure gereinigt und 2 Std. im Durchflußbad gespült. Bei 10 beliebig ausgewählten, mit H₂O dest. gefüllten Röhrchen wurden die Transmissionen bei 578 nm gemessen. Die Röhrchen wurden derart kalibriert, daß die Transmission $\pm$ 1% vom Absorptionsmittelwert lag. Anschließend Trocknung der Röhrchen im Heißluftsterilisator, Verschluss

mit Edelstahlkappen und erneutes Sterilisieren
30 Minuten bei 180°C.

Herstellung von Verdünnungsreihen.

TMP-Konzentrationsbereich von 1 mg/ml-0,01 µg/ml Medium.

Nach folgendem Schema wurde verfahren:

1000 µg/ml:davon	0,5 ml	
	<u>+ 4,5 ml TSB</u>	
5 ml	100 µg/ml Gemisch:davon	0,5 ml
	<u>+ 4,5 ml TSB</u>	
	5 ml	10 µg/ml Gemisch:
		usw.

Zwei Röhrchen werden jeweils mit 5 ml reiner TSB gefüllt und als Kontrollen ohne Hemmsubstanz verwertet. Der Rest der einzelnen Gemische wurde steril in verschraubbare Reagenzgläser pipettiert und bei -30°C eingefroren.

Beimpfung.

Die Transmissionen der Vorkulturen nach 24 Std. wurden bei 578 nm gemessen und nach Tab. 3 in Trockensubstanz Bakterien/ml umgerechnet. Die Vorkulturen wurden schließlich so verdünnt, daß mit 0,1 ml Inoculum 0,2 µg Trockensubstanz Bakterien gleichmäßig pro 5 ml Ansatz eingesät wurden. Die Kulturröhrchen wurden dann bei 30°C in Schräglage geschüttelt und das Wachstum anhand der Transmission der Kulturröhrchen bei 578 nm verfolgt. Dabei diente ein unbeimpftes Röhrchen mit TSB als Blindwert. Bei Wachstumshemmung sollte man im Vergleich zur Kontrollkultur eine geringere Steilheit und eine Kultur-ertragshemmung erwarten dürfen.

Bei den E. coli Stämmen FDA und 38954 wurde der Einfluß von Ammonium-Glucose Medium und Mueller-Hinton Broth (Oxoid, Ltd.) auf die TMP-Wachstums hemmung untersucht.

Bestimmung der 50%-igen Hemmkonzentrationen (HK_{50}) in Trypticase Soy Broth.

Obwohl mit der Feststellung eines erniedrigten Wachstumsertrages zwar qualitativ eine TMP-Hemmwirkung belegt werden kann, genügt dieser Parameter nicht, um eine über die TMP-Hemmwirkung quantitative Aussage zu machen. Hierzu wurde die 50%-ige Wachstumshemmung einer Population durch eine bestimmte TMP-Konzentration bestimmt. Aus den Transmissionswerten nach 12 bzw. 24 Std. wurde die entsprechende HK_{50} graphisch ermittelt. Die TMP-Konzentrationen (Abszisse) wurden dazu in Abhängigkeit der Menge Bakterientrockensubstanz/ml (Ordinate) als Kurve aufgetragen. Der Schnittpunkt einer Abszissenparallele im Abstand von 50% des Wachstumsertrages der O-Kontrolle ermöglicht das Ablesen der HK_{50} in $\mu\text{g/ml}$ TMP. Als minimale Hemmkonzentration (MHK) kann der letzte Punkt der Kurve angesehen werden, bevor diese asymptotisch verläuft.

Wiederholungsuntersuchungen mit E. coli Stämmen FDA und 38954 wurden im Bereich der beim vorhergehenden Versuch gefundenen HK_{50} mit enger abgestuften Verdünnungsreihen durchgeführt, um einen genaueren HK_{50} -Wert ermitteln zu können.

Untersuchungen im Gradienteninkubator.

Aufbau und Eichung des Gradienteninkubators.

Jeweils fünf Röhrchen einer Querreihe gehören zu einer Temperatur. Diese fünf Röhrchen enthalten verschiedene TMP-TSB-Gemische. Von den Querreihen existieren 18 Lagen, wobei in jeder Lage eine andere Temperatur herrscht als in der benachbarten. Die Temperaturregelung erfolgt über ein Wasserbad. Am oberen Ende des Gradienteninkubators - der Gradienteninkubator steht mit einer Neigung von ca.

30° - können die wärmsten Temperaturen, am unteren Ende die kältesten Temperaturen gemessen werden. Kulturen, die sich im Gradienteninkubator befinden, wachsen unbelüftet.

Der Gradienteninkubator wurde 24 Std. vor Beginn des Versuches eingeschaltet, um eine Stabilisierung des Gradienten zu erreichen. Während der Untersuchung wurde er über einen automatischen Schreiber laufend registriert und nach Beendigung in den Querreihen 1, 5, 9, 13 und 17 überprüft.

Herstellung verschiedener Kulturansätze.

Für die Untersuchungen im Gradienteninkubator wurden kurze, optisch einwandfreie, sterilisierte Röhrchen verwendet, die mit Metallkappen verschlossen waren. Zunächst wurden nach mengenmäßig modifiziertem Schema TMP-TSB-Gemische mit folgenden vier TMP-Konzentrationen hergestellt.

- | | | | | | | |
|----|-------|--------------|------------|-------------------|----------|----------|
| 1. | 100ml | eines | 100 /ug/ml | TMP-TSB-Gemisches | -entspr. | A-Kurven |
| 2. | " | " | 10 /ug/ml | " | " | B- " |
| 3. | " | " | 1 /ug/ml | " | " | D- " |
| 4. | " | " | 0,1 /ug/ml | " | " | E- " |
| 5. | " | TSB ohne TMP | | | " | C- " |

in Abb. 5.

Die Vorkultur wurde so verdünnt, daß mit 0,1 ml Inoculum 0,4 /ug Trockensubstanz Bakterien pro 100 ml Ansatz eingesät wurde. Die Suspensionen wurden gut gemischt und aus einem Ansatz 18 Röhrchen mit jeweils 4 ml pipettiert. Die Startzeit einer jeweiligen Längsreihe mit Beginn des Wachstums im Gradienteninkubator wurde gesondert markiert.

Das Wachstum wurde zweistündlich turbidimetrisch verfolgt; nach 96 Std. wurde die Untersuchung beendet (Abb. 5 u. 6).

Bestimmung des Spontanverlustes von Resistenz-
eigenschaften bei 30°C und bei 45°C.

Zwei mit 5 ml TSB gefüllte Röhrchen wurden mit einer Öse beimpft und unbelüftet bei 30°C und 45°C (Wasserbad) inkubiert. 6, 12 und 24 Std. später wurde eine Öse der Suspension mit Drigalski-Spateln auf Blutagarplatten fraktioniert und 24 Std. bei 30°C inkubiert. Von 50 verschiedenen Klonen wurde schließlich ein Antibiotogramm des Multodiskstern-Code 3636 E bestimmt.

Prüfung der Elimination durch Ethidium-Bromid-
Behandlung (EB).

Nach der schon im ersten Versuch geschilderten Methode wurde ein EB-TSB-Gemisch (ETM) mit einer EB-Konzentration von 1 mg/ml Medium hergestellt. Dieses Gemisch wurde steril filtriert und in folgenden Endkonzentrationen in verschraubbare Glasflaschen pipettiert.

Reihe der Endkonzentrationen:

500	/ug/ml	ETM
100	/ug/ml	"
10	/ug/ml	"
1	/ug/ml	"
80	/ug/ml	"
60	/ug/ml	"
40	/ug/ml	"
20	/ug/ml	"

Diese Gemische wurden bis zum Versuchsbeginn bei +4°C aufbewahrt.

Bei Durchführung wurden lange, kalibrierte, sterilisierte und mit Edelstahlkappen versehene Jenaer Glas-Röhrchen verwendet. Zwei Verdünnungsreihen wurden mit den oben hergestellten EB-Konzentrationen (1000 /ug/ml-20 /ug/ml) mit jeweils 5 ml Gemisch pipettiert. Während die eine

Verdünnungsreihe in bekannter Weise mit $0,2 \mu\text{g}$ Trockensubstanz Bakterien pro 5 ml-Ansatz beimpft wurde, blieb die zweite Reihe unbeimpft. Diese wurde als Blindreihe bei der turbidimetrischen Messung benutzt, da das rote EB mit steigender Konzentration zunehmend Licht absorbiert, wobei diese zusätzliche Mehrabsorption nicht mit in die Trübungsmessung eingehen darf. Mit der so als Blindprobe benutzten Leerreihe wurde bei jeder Messung der Nullpunkt neu geeicht, so daß die absolute Trübungszunahme der gewachsenen Kultur registriert wurde. Die Leerreihe wurde während des Wachstums der Kulturen bei 30°C im Schüttelinkubator ebenso in Dunkelheit aufbewahrt, damit die Farbintensität genausowenig beeinflußt werden konnte, wie in der beimpften Verdünnungsreihe. Alle zwei Stunden wurde der Wuchs turbidimetrisch bei 578 nm verfolgt.

Nach 12 Std. wurde die subinhibitorische EB-Konzentration an Hand der Transmissionswerte, d. h. der Wachstumserträge bestimmt. Da nicht bekannt war, ob diese subinhibitorische EB-Konzentration auch den größten TMP-Eliminationseffekt hervorbringen würde, wurden auch aus den benachbarten Röhrchen Keimproben entnommen. Mit jeweils einer Öse wurde in der gleichen ETM eine Subkultur erneut 12 Std. bei 30°C belüftet inkubiert. Daneben wurde jeweils eine Öse auf Blutagar mittels der Dalgalski-Spateltechnik über drei Platten fraktioniert. Die Elternkulturen wurden direkt nach der Entnahme weitere 12 Std. wieder bei 30°C im Schüttelinkubator inkubiert. Danach wurden ihre bis dahin erreichten Erträge gemessen. Ebenso wurden die Keimproben, aus den drei entsprechenden Röhrchen sowohl der Elternkultur als auch der 1. Subkultur fraktioniert. Eine 2. Subkultur wurde beimpft, 12 Std. bei 30°C belüftet, inkubiert und im Anschluß daran eine Fraktionierung in der geschilderten Weise vorgenommen.

Von den geklonten Kulturen wurden entsprechend der Tab.10 Resistenzmuster bestimmt, wobei zunächst vom Multodiskstern Code 3636 E das Antibiogramm bestimmt wurde.

Erschien TMP-Sensibilität, so wurde von der ersten Resistenzplatte eine Keimprobe entnommen und das Antibiogramm des Multodisksterns Code 3628 E bestimmt.

LEDERBERG-Stempeltechnik-Verfahren.

Zur Bestimmung der TMP-Sensibilität der mit EB-behandelten Keime des E. coli Stammes 38954 wurde neben der Bestimmung der TMP-Resistenzverlustrate durch den Blättchentest versucht, mit einer Parallelmethode nach der Lederberg-Stempeltechnik (LEDERBERG 1952) eine Übereinstimmung der Ergebnisse zu erzielen. Hierzu wurden zunächst Selektivnährböden aus Tryptic-Soy-Agar (TSA) mit 1,5 µg TMP/ml gegossen. Die Platten wurden in einem sterilen Inkubator getrocknet und bis zur Verwendung bei +4°C gelagert. Auf den Selektivnährböden wuchsen TMP-resistente Stämme, TMP-sensible Stämme hingegen nicht.

Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C wurde die Anzahl der Klone auf der ursprünglichen Blutagarplatte mit der auf dem Selektivnährmedium verglichen.

Übertragungsversuche der TMP-Resistenz in Mischkulturen.

Wenn die TMP-Resistenz aus Enterobakterien mittels EB in einer angemessenen Rate herauslösbar ist, so ist dies ein Hinweis für eine extrachromosomale Lokalisation der TMP-Resistenzdeterminantion. Dies würde bedeuten, daß die TMP-Resistenzdeterminante unter geeigneten Bedingungen auch auf Nachbarkeime übertragbar sein müßte.

Es wurden Selektivnährmedien aus TSA mit 1,5 µg/ml TMP und Kochblutagarplatten verwendet. Von den reinen Donator- und Akzeptorstämmen wurden Vorkulturen hergestellt und derart verdünnt, daß für jeden Stamm mit 0,1 ml Inoculum

0,2/ug Trockensubstanz Bakterien pro 5 ml-Mischkultur-
ansatz aus TSB eingesät wurde, d. h. 0,4/ug/Trocken-
substanz Bakterien in 5,2 ml Mischkulturenansatz. Nach
12 Std. bei 30°C im Schüttelinkubator wurde eine Öse
je Mischkultur auf dem TMP-haltigen TSA und Kochblut-
agar fraktioniert.

RESULTE

Häufigkeit der Trimethoprim-Resistenz bei Enterobacteriaceae und S. aureus aus klinischem Material im Agar-Diffusionstest von 1970 bis 1972.

Neben der prozentualen Häufigkeit der TMP-Resistenz zeigt Tab. 4 auch die prozentuale Häufigkeit der Sulfonamidresistenz. Die Enterobacteriaceae sind in der Häufigkeit des eingegangenen Materials 1970 von oben nach unten aufgeführt. Zwar schwankt der prozentuale Anteil von Jahr zu Jahr geringfügig (Spalte 2), die Rangfolge innerhalb der untersuchten Enterobacteriaceae bleibt jedoch erhalten. Bei den Proteus-, Enterobacter-, Citrobacter-Spezies und S. aureus kann ein prozentuales Ansteigen der TMP-Resistenz von mehreren Prozent im angegebenen Zeitraum festgestellt werden, während die TMP-Resistenz bei E. coli Veränderungen von nicht einmal 1 % erkennen läßt.

Anmerkung: Bei der statistischen Erhebung der TMP- und G-Resistenz der Jahre 1970-1972 (vgl. Tab. 4) wurde die TMP-Resistenz im Jahr 1970 nur an ausgewählten Stämmen geprüft. Im Jahr 1971 wurde routinemäßig auf jede Platte ein einzelnes TMP-Testblättchen an dem Rand aufgelegt, während 1972 Multodisksterne Code 3636 E verwendet wurden.

Unter P. aeruginosa wurde seit 1970 kein TMP-sensibler Stamm isoliert.

In Tab. 5 ist die Häufigkeit gleicher Resistenzmuster von 25 E. coli-, 186 Proteus-, 86 Klebsiella-, 25 Enterobacter- und 30 S. aureus-Stämmen aufgeführt, die 1970 und 1971 isoliert worden sind. Dabei fällt bei E. coli auf, daß von 25 TMP-resistenten Stämmen 22 Stämme auch Sulfonamid (G)-Resistenz aufweisen. Neben der TMP- und G-Resistenz

konnten bei den mehrfach auftretenden Resistenzmustern in allen Fällen der E. coli-Stämme auch Resistenzeigenschaften gegen Cephalothin festgestellt werden.

Auch bei den Proteus-Stämmen zeigen bis auf 3 Stämme mit gleichem Resistenzmuster alle anderen mehrfach auftretenden Resistenzmuster die G-Resistenz mit der TMP-Resistenz gepaart. Hier kommt die Resistenzeigenschaft gegen Colistin mit Chloramphenicol- und Nitrofurantoin-Resistenz in allen Fällen vor, die gegen Cephalothin- und Tetracyclin-Resistenz relativ häufig. Bei den Klebsiella-Stämmen zeigen neben den in allen Fällen auftretenden Resistenzeigenschaften gegen TMP und G auch die Resistenzeigenschaften von Cephalothin, Chloramphenicol und Nitrofurantoin in ihrem Auftreten eine größere Häufigkeit. Carbenicillin, Kanamycin, Streptomycin und Nalidixinsäure sind weniger häufig. Die Kombination mit Cephalothinresistenz zusammen mit der TMP- und G-Resistenz ist auch bei den mehrfach auftretenden Resistenzmustern der Enterobacteres feststellbar.

Bei den S-aureus-Stämmen ist die TMP-Resistenzeigenschaft dreimal mit der G-Resistenz und dreimal mit der Penicillin- und Ampicillinresistenz kombiniert.

Die Tab. 6a zeigt, wie häufig unter einer Anzahl getesteter Stämme aus Tab. 5 die TMP-Resistenz mit Resistenzeigenschaften gegen andere Antibiotika gemeinsam auftrat. Bei der Beurteilung ist jedoch zu berücksichtigen, daß Enterobacteriaceae in der getesteten Konzentration auf den Multidise-Sternen mit Ausnahme von P. mirabilis resistent sind gegen Penicillin und Cloxacillin. Die offenbar primär TMP-resistenten P. aeruginosa weisen außerdem Resistenzeigenschaften gegen Sulfonamide, Cephalothin, Chloramphenicol, Nitrofurantoin, Kanamycin und Nalidixinsäure in hoher Häufigkeit auf.

Welche Resistenzeigenschaften neben der TMP-Resistenz nun am häufigsten auftreten, verdeutlicht am besten

Tab. 6b, in der das arithmetische Mittel der Rangfolgen aus Tab. 6a bei den untersuchten Enterobacteriaceae vorkommenden Antibiotikaresistenzen ermittelt worden ist.

Bei den S. aureus ist ebenfalls die G-Resistenz neben der TMP-Resistenz am häufigsten.

Die Wirkung der Trimethoprim-Sulfamethoxazol-Kombination im Agardiffusionstest.

Bei einigen beliebig ausgewählten Stämmen wurde das Verhalten gegenüber TMP und SMZ allein und in Kombination im Agardiffusionstest beobachtet und anhand der Hemmhofgrößen die Wirkqualität der Einzelsubstanzen und der Kombination festgestellt (Tab. 7).

In der Regel ergab sich bei den E. coli eine deutliche Hemmhofvergrößerung; nur bei 5 von 36 geprüften Stämmen konnte keine Hemmhofvergrößerung gegenüber dem TMP-Hemmhof gemessen werden. Liegt bei nur einer der beiden Substanzen keine Hemmhofbildung vor, so ist entweder keine oder nur eine geringgradige Hemmhofvergrößerung bei Kombinationen zu beobachten. Besteht weder gegen TMP noch gegen SMZ Empfindlichkeit, so kann die Kombination dennoch eine Hemmhofbildung bzw. -vergrößerung bewirken. Dies ist bei einem Proteus-Stamm, einem K. oxytoca-Stamm und zwei Stämmen von S. aureus in typischer Weise, bei dem untersuchten P. aeruginosa in unerwarteter Weise der Fall. Der auch gegen die Kombination resistente Proteus-Stamm 7034 zeigt auch im Röhrchentest im Vergleich zu den anderen TMP-resistenten Proteus-Stämmen ein extrem hohes Resistenzverhalten (siehe Tab. 8).

Die Trimethoprimwirkung auf das Wachstum von
Enterobacteriaceae und S. aureus in flüssigen Medien.

Effekt von Trimethoprim auf die turbidimetrische
Wachstumskurve.

Das Wachstum einer Bakterienkultur wird in graphischer Darstellung anschaulich, wenn man die Logarithmen der Lebendzellzahl oder der Bakterienmasse im ml gegen die Zeit aufträgt. Eine typische Wachstumskurve hat sigmoide Gestalt und läßt eine Latenzphase, eine Exponentialphase, eine stationäre Phase und eine Absterbephase unterscheiden. Die erreichte Bakterienmasse nennt man Kulturertrag. Je nach der TMP-Konzentration im entsprechenden Röhrchen kann 1. die Latenz-Phase verlängert, 2. die Exponentialphase flacher und 3. der Kulturertrag vermindert werden (WK 1). Außerdem zeigen die Wachstumskurven unter TMP-Einfluß Formveränderungen und mehrphasischen Wachstumsverlauf (z. B. WK 3). Das Ausmaß der Veränderungen dieser Kriterien gibt eine Aussage über die konzentrationsabhängige Hemmwirkung des TMP. Trifft nur eines dieser Kriterien zu, so kann man unter Umständen schon von einer Hemmwirkung sprechen. Derart ist anhand der Verminderung des Kulturertrages am ehesten eine Hemmwirkung zu erkennen, vorausgesetzt die Bebrütungstemperatur, der pH-Wert und ähnliche Einflüsse sind konstant (vgl. Abb. 9).

Vergleich turbidimetrischer Wachstumskurven von im
Blättchentest Trimethoprim-sensiblen und Trimethoprim-
resistenten Kulturen.

Die WK 1 von E. coli 38954 in TSB zeigt beispielsweise einen deutlichen Unterschied sowohl in der Höhe der Kulturerträge als auch in dem Zeitpunkt des Erreichens der Kulturerträge im Vergleich zu den ungehemmten Kontrollen, den durch geringe TMP-Konzentrationen kaum gehemmten Kulturen und dem deutlichen Hemmeffekt bei 100 und 1000 $\mu\text{g/ml}$ Medium. Diese veränderten Kriterien der Wachstums-

kurven sind sowohl nach 24 Std. als auch nach 48 Std. Bebrütung gut erkennbar, woraus zu schließen ist, daß die TMP-Wirkung über diese Zeit unverändert andauert. Auch bei einem Vergleich der Kurven untereinander ist bezüglich der Wachstumsraten und der Latenz-Phasen die Hemmwirkung gut erkennbar. So wird bei den Kulturen, die mit 100 und 1000 $\mu\text{g/ml}$ TMP gehemmt werden, eine deutliche Latenz-Phase zwischen 4 und 6 Std. erkennbar; die Wachstumsraten sind mit steigender TMP-Konzentration immer geringer. Wachstumsraten sind ein Maß für die Geschwindigkeit des Zellwachstums während der Exponentialphase. Die WK 2 zeigt den TMP-Hemmeffekt auf E. coli 38954 in differenzierteren abgestuften TMP-Konzentrationen nach 24 Std. Als Gegenüberstellung zeigt die WK 3 E. coli FDA in TSB. Der Hemmeffekt des TMP ist hier auch noch bis etwa 0,1 $\mu\text{g/ml}$ gut erkennbar, d. h. deutlich um eine Größenordnung der TMP-Konzentration geringer als bei den Wachstumskurven des im Blättchentest TMP-resistenten E. coli 38954.

Die WK 4 zeigt den TMP-Hemmeffekt auf E. coli FDA in differenzierteren abgestuften TMP-Konzentrationen nach 24 Std.

Zum Vergleich zeigt die WK 5 einen anderen im Blättchentest TMP-sensiblen E. coli 39188 in TSB. Auch hier ist ein deutlicher Hemmeffekt bis 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Medium zu erkennen. Die TMP-Hemmkonzentration scheint somit bei diesem Stamm in der gleichen Größenordnung zu liegen, wie bei E. coli FDA.

Abhängigkeit der Trimethoprim-Hemmwirkung von der Zusammensetzung des Mediums.

Das Wachstum des E. coli 38954 in MHB zeigt WK 6. Die Hemmeffekte sind hier bei 100 und 1000 $\mu\text{g/ml}$ ebenfalls gut erkennbar; die Kurven sind beim Aufeinanderlegen mit denen in TSB fast kongruent, so daß sich anhand der

Wachstumskurven kein Einfluß des anderen Mediums (MHB) auf die TMP-Hemmwirkung feststellen läßt.

Die WK 7 zeigt das Wachstum des gleichen Stammes in einem 0,5 %igen Ammoniumglucose-Nährmedium. Im Gegensatz zu den vergleichbaren Kurven in den beiden anderen Medien erkennt man, daß die Latenz-Phasen länger, die Exponentialphasen flacher und die erreichten Kulturerträge niedriger sind. Hier ist auch bei 10 $\mu\text{g/ml}$ ein deutlicher Hemmeffekt zu registrieren.

Das Wachstum des E. coli FDA in einem 5 %igen Ammoniumglucose-Nährmedium zeigt die WK 8. Wie schon bei dem TMP-resistenten E. coli 38954 ist auch bei diesem Stamm in diesem Medium ein deutlich gleichsinniger Einfluß auf die durch TMP-gehemmten Wachstumskurven festzustellen.

Die Wachstumskurven des E. coli FDA in MHB zeigten zu den Wachstumskurven in TSB keine wesentlichen Verschiedenheiten.

HK₅₀ bei Trimethoprim-sensiblen und Trimethoprim-resistenten Stämmen.

Definition der Trimethoprim-Hemmwirkung anhand der HK₅₀.

Neben der Beurteilung der TMP-Hemmwirkung durch Beeinflussung auf Kulturerträge, Wachstumsraten und Latenz-Phasen bei turbidimetrisch gemessenen Wachstumskurven, gibt die TMP-Konzentration, die 50 % einer Population in der Lage ist zu hemmen, eine quantitative Aussage über die TMP-Hemmwirkung. Zur Messung der beimpften Verdünnungsreihe bei 30°C im Schüttelinkubator wurde die Transmission der Kulturröhrchen 2-stündig bei 578 nm verfolgt, wobei ein unbeimpftes Röhrchen als Blindwert diente. So zeigt Abb. 4 die Hemmwirkungskurve für E. coli 38954 nach einer Wachstumsdauer von 26 Std. in TSB, aus der

die $HK_{50} = 12 \text{ } \mu\text{g/ml}$ graphisch ermittelt wurde.

Die Abb. 4 zeigt zusätzlich die gleiche Kurve für E. coli FDA.

HK₅₀-Werte Trimethoprim-sensibler und Trimethoprim-resistenter Stämme.

Aus diesen Hemmwirkungskurven der E. coli-Stämme 38954 und FDA (Abb. 4) ist ein deutlicher Unterschied zwischen der HK_{50} des im Blättchentest TMP-sensiblen Stammes (ca. $0,3 \text{ } \mu\text{g/ml}$) und der des im Blättchentest TMP-resistenten Stammes (ca. $12 \text{ } \mu\text{g/ml}$) erkennbar.

In Tab. 8 sind weitere 18 Stämme aufgeführt, bei denen jedoch nur nach 12 und 24 Std. Transmissionsmessungen durchgeführt wurden. Die HK_{50} -Werte der im Blättchentest TMP-sensiblen E. coli-Stämme betragen im Mittel $0,354 \text{ } \mu\text{g/ml}$, die der im Blättchentest TMP-resistenten E. coli im Mittel $8,9 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Bei den Vertretern der Gattung Proteus läßt sich für den TMP-sensiblen Stamm eine HK_{50} von $1,06 \text{ } \mu\text{g/ml}$ und für die beiden TMP-resistenten Stämme ein HK_{50} -Mittel von $109,5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ errechnen.

Der untersuchte Vertreter der TMP-sensiblen Klebsiella hat eine HK_{50} von $0,33 \text{ } \mu\text{g/ml}$, die TMP-resistenten Klebsiella-Vertreter lassen eine HK_{50} von $11,8 \text{ } \mu\text{g/ml}$ ermitteln.

Eine HK_{50} von $0,58 \text{ } \mu\text{g/ml}$ hatte der TMP-sensible Enterobacter-Stamm, während das Mittel der beiden TMP-resistenten Vertreter dieser Gattung bei $4,15 \text{ } \mu\text{g/ml}$ lag.

Der P. aeruginosa hatte eine HK_{50} von $100 \text{ } \mu\text{g/ml}$.

Die S. aureus hatten für ihre drei TMP-resistenten Stämme im Durchschnitt eine HK_{50} von $21,8 \text{ } \mu\text{g/ml}$; der TMP-sensible S. aureus hatte eine HK_{50} von $0,49 \text{ } \mu\text{g/ml}$.

Neben den HK_{50} -Werten ist auch noch die minimale TMP-Hemmkonzentration (MHK) in Tab. 8 größenordnungs-
mäßig angegeben.

Vergleich zwischen der Trimethoprim-Wirkung auf die
turbidimetrische Wachstumskurve und der HK_{50} von
Trimethoprim in den verschiedenen Medien.

Während sich beim Vergleich der Wachstumskurven in den
verschiedenen Medien kein Unterschied zwischen TSB und
MHB zeigte, ist zwischen der HK_{50} in TSB und MHB des
E. coli 38954 ein Unterschied von einer Größenordnung
festzustellen, obwohl der erreichte Kulturertrag der
ungehemmten Kultur in MHB ebenso groß ist wie in TSB
(vgl. WK 6). Im Ammoniumglucose-Nährmedium ist die
 HK_{50} eine 10er Potenz geringer als in TSB, was mit der
TMP-Hemmwirkung der turbidimetrisch gemessenen Wachstums-
kurve in Übereinstimmung steht (vgl. WK 7).

Wachstumsabhängigkeit des Stammes E. coli 38954 von
verschiedenen Temperaturen und Trimethoprimkonzentrationen.

Allgemeine Betrachtung der turbidimetrischen Wachstums-
kurven bei unterschiedlicher Bebrütungstemperatur.

Abb. 3 zeigt den Inkubator-Temperatur-Gradienten vor und
nach dem Versuch sowie die Idealkurve, woraus die Tempera-
tur für einzelne Querreihen abgelesen wurde. Folgende
Temperaturen wurden gemessen:

Vorher: 2 = $21,7^{\circ}\text{C}$; 6 = $27,6^{\circ}\text{C}$; 10 = $33,1^{\circ}\text{C}$; 14 = $39,4^{\circ}\text{C}$;
18 = $45,6^{\circ}\text{C}$.

Die Temperatur betrug im Kaltbad 15°C , im Warmbad $51,6^{\circ}\text{C}$.
Nachher: 1 = $20,2^{\circ}\text{C}$; 5 = $26,0^{\circ}\text{C}$; 9 = $32,0^{\circ}\text{C}$; 13 = $37,5^{\circ}\text{C}$;
17 = $41,0^{\circ}\text{C}$.

Kaltbad: 15°C ; Warmbad: $52,0^{\circ}\text{C}$.

Die Wachstumskurven der ersten und achtzehnten Querreihe

sind in Abb. 5 und Abb. 6 dargestellt; die Wachstumskurven der Querreihen 2 - 17 (vgl. auch Tab. 9) verlaufen in Analogie dazu unregelmäßig abgestuft zwischen diesen beiden Endpunkten. Alle Kurven zeigen ab 28,8°C zunächst einen biphasig, im wärmeren Bereich einen mehrphasigen Verlauf, dessen Ausprägung mit Zunahme der Temperatur immer deutlicher wird. Nach Erreichen des Kulturertrages zu unterschiedlichen Zeiten (vgl. Tab. 9 und Abb. 7), erfolgt leichter Kurvenabfall, bisweilen auch ein stationärer Verlauf, um nach einigen Stunden erneut anzusteigen. Der Kulturertrag der durch TMP gehemmten Kulturen erreicht aber nie den der ungehemmten Kontrollkulturen. Auf Abb. 7 ist bei den Kulturen, die mit 100 µg TMP/ml gehemmt sind, deutlich der Einfluß der langen Latenzphase zu erkennen. Die anderen Kulturen erreichen ihre stationäre Phase meist schneller als die ungehemmten Kulturen.

Verlängerung der Latenzphase.

Während die ungehemmten Kontrollkulturen bei keiner der 18 im Gradienteninkubator verwendeten Temperaturstufen eine meßbare Latenzphase aufweisen, sind in Gegenwart der höheren TMP-Konzentrationen (10 bzw. 100 µg/ml) sowohl im suboptimalen als auch im supraoptimalen Temperaturbereich erheblich verlängerte Latenzzeiten zu beobachten, die auf der kalten Seite des Gradienten bis zu 20 Std. betragen (vgl. auch Abb. 5, 6 und 7).

Verminderung der Wachstumsraten.

Die Wachstumsraten sind bei allen Bebrütungstemperaturen dosisabhängig vermindert. Während die Kontrollkulturen im kalten Milieu langsam wachsen, nimmt die Steigung der Exponentialphase (Höhe der Wachstumsraten) im suboptimalen Temperaturbereich stark zu, bleibt im optimalen Temperaturbereich nahezu konstant, um im supraoptimalen Temperaturbereich wieder geringfügig abzufallen.

Die gehemmten Kulturen zeigen im kalten Milieu geringe Wachstumsraten, wobei jedoch die TMP-Konzentration direkt Einfluß auf die Höhe der Wachstumsraten nimmt. Die Wachstumsrate der ungehemmten Kultur ist in allen Temperaturbereichen größer als die der in 0,1 μg TMP/ml, größer oder gleich 1 μg TMP/ml, größer oder gleich 10 μg TMP/ml, größer oder gleich 100 μg TMP/ml wachsenden Kultur. Während die Wachstumsraten der Kulturen der B-C-D- und E-Kurven bis 33,1°C stark ansteigen, bleibt die Wachstumsrate der A-Kurven immer viel geringer. Von 34,6 - 40,4°C verhalten sich die Wachstumsraten relativ stabil, - vor allem in den A-C- und D-Kurven - um im wärmeren Milieu wieder deutlich abzunehmen. Diese Verhältnisse sind in Abb. 8 dargestellt.

Verminderung der Kultureerträge.

Die Kultureerträge in Abhängigkeit zur Temperatur sind in Abb. 9 dargestellt. Die ungehemmten Kulturen erreichen zu unterschiedlichen Zeiten bis zum optimalen Temperaturbereich alle fast den gleichen Kultureertrag, wohingegen die Erträge im supraoptimalen Bereich geringfügig abnehmen. Bei den durch TMP deutlich beeinflussten Kultureerträgen ist dies hingegen nicht der Fall. Diese bleiben im warmen Milieu entweder konstant oder steigen leicht an. Die jeweils erstmals erreichten Kultureerträge sind in den Kulturen mit den TMP-Konzentrationen 1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ deutlich niedriger als die der ungehemmten Kontrolle oder der Kultur mit 0,1 μg TMP/ml Medium. Vergleicht man den Kurvenverlauf der durch TMP kaum oder gar nicht gehemmten Kultureerträge untereinander ebenso wie die Kurvenverläufe der von TMP stark beeinflussten Kultureerträge, so ist das Kurvenverhalten in beiden Mengen untereinander sehr ähnlich (vgl. auch Tab. 9).

HK₅₀ in Abhängigkeit von der Bebrütungstemperatur.

Wie aus Abb. 10, in der die HK₅₀ in Abhängigkeit zur

Temperatur aufgetragen ist, hervorgeht, ist eine Verminderung der HK_{50} und damit eine Zunahme der TMP-Wirkung im suboptimalen Temperaturbereich von $20,2 - 30,2^{\circ}\text{C}$ zu beobachten, während ab $31,7^{\circ}\text{C}$ die HK_{50} -Werte bis $44,6^{\circ}\text{C}$ wieder zunehmen, was bedeutet, daß die TMP-Wirkung in vitro im wärmeren Milieu wieder abnimmt. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit dem beschriebenen Temperatureinfluß auf die TMP-Wirkung auf Kulturerträge (Abb. 9) und Wachstumsraten (Abb. 8).

Untersuchungen zur Genetik der Trimethoprimresistenz.

Die Untersuchungen über die TMP-Hemmwirkungen wurden damit abgeschlossen. Zur Frage nach der Lokalisation der TMP-Resistenz sollte zunächst versucht werden, diese mittels dem DNA-Gift Ethidium Bromid aus resistenten Organismen herauszulösen. Zur Beurteilung der Ethidium-Bromid-Eliminationsrate. mußte jedoch vorher die Spontanverlustrate des TMP bestimmt werden.

Spontanverlust der Trimethoprimresistenz.

Bekanntlich sind DNA-Gifte wie Akridinorange oder Ethidium-Bromid in der Lage, Plasmide aus Mikroorganismen zu eliminieren. Falls die TMP-Resistenzdeterminante extrachromosomal lokalisiert sein sollte, müßte durch Elimination extrachromosomaler Elemente der TMP-Resistenzverlust signifikant höher sein als spontan. Der Spontanverlust der TMP-Resistenz des E. coli 38954 wurde bei 30°C und 45°C in unbelüfteten Kulturen bestimmt und ergab Verlustraten zwischen 0 % und 20 % (vgl. Tab. 11).

Gleichzeitig wurde dabei ein Ciclacillin Spontanresistenzverlust zwischen 36 % und 100 % beobachtet. Verlust der Sulfonamidresistenz wurde nach 24 Std. bei 30°C nur einmal beobachtet.

Elimination der Trimethoprimresistenz durch Ethidium-Bromid-Behandlung.

Im folgenden wurde der gleiche Stamm mit EB behandelt, um festzustellen, ob die TMP-Resistenzeigenschaft durch diesen Farbstoff zu eliminieren ist. Die Abb. WK 9 zeigt die Wachstumskurve des E. coli 38954 in EB. Eine Verminderung des Ertrages ist turbidimetrisch meßbar bis zu 60 μg EB/ml Medium. Die Latenz-Phase ist bis 80 μg /ml deutlich verzögert, während die Wachstumsrate bei 100 μg /ml deutlich reduziert ist. Die Hemmwirkungskurve (Abb. 11) zeigt ebenso wie die Wachstumskurven, daß der Kulturertrag erst bei etwa 10 μg /ml erreicht wird. Auch die Konzentrationsstufen 20 und 40 μg /ml sind noch als subinhibitorische Konzentrationen anzusehen, wenn auch die Differenz der Erträge gering ist. Wie die Eliminationsergebnisse in Tab. 10 zeigen, war die TMP-Resistenzelimination bei 60 μg /ml am größten.

Weiterhin sind in Tab. 10 die Eliminationsfrequenzen bei den übrigen mit EB behandelten Stämmen aufgeführt. Bei diesen Stämmen wurde keine Subkultivierung mehr durchgeführt, sondern nach 12-stündiger Inkubation entsprechend der geschilderten Methode verfahren. Die Verlustraten der TMP-Resistenz schwanken zwischen 0% und 100 %. Daneben konnte gleichzeitig der Verlust der Resistenzeigenschaften gegen Ci, S, PN, TE, C, P und G beobachtet werden. Verlust der TMP-Resistenz allein wurde in keinem Fall beobachtet. Die Schwankungsbreite der Resistenzverlustraten betrug bei Ci 4 - 76 %, bei S 2 - 8 %, bei PN 24 - 92 % und bei C 2 - 40 %. Einmal wurde ein P-Resistenzverlust von 28 %, einmal eine TE-Resistenzverlust von 8 % und schließlich bei einem S. aureus einmal ein G-Resistenzverlust von 8 % beobachtet.

Die Bestimmung des TMP-Resistenzverlustes nach dem Stempelverfahren von LEDERBERG ergab bei dem E. coli 38954 nach 12 Std. in 60 μg /ml und nach 12 Std. in 80 μg /ml mit den

Resultaten von Klonen im Blättchentest eine hinreichend gute Übereinstimmung, während bei weiteren Gegenüberstellungen prozentuale Unterschiede von 8 - 27 % vorkommen. Die Bestimmung in flüssigen Medien mit den TMP-sensibel gewordenen Stämmen erbrachte mit einer Ausnahme für alle Stämme keine zur in Tab. 8 angegebenen HK_{50} -Unterschiede, d. h. die HK_{50} -Werte lagen nicht im Bereich artgleicher TMP-sensibler Stämme. Bei E. coli 68489 jedoch zeigt der mit EB behandelte Keim im Gegensatz zu der parallel gewachsenen Elternkultur eine HK_{50} von 0,16 μ p TMP/ml (Abb. 11), somit einen HK_{50} -Wert, der deutlich im Bereich der TMP-sensiblen Colibakterien liegt. Die HK_{50} der Elternkultur war mit 3,5 μ g/ml deutlich eine Zehner-Potenz höher (Abb. 11) und liegt im Bereich der TMP-resistenten Colibakterien (Vgl. Tab. 8).

Übertragung der Trimethoprimresistenz in Mischkulturen.

Die Übertragung der TMP-Resistenz wurde mit folgenden Stämmen versucht:

Donator	Akzeptor
<u>E. coli</u> 38954	<u>E. coli</u> K ₁₂ -ATCC 12435
38954	<u>Citrobacter freundii</u> 266-2
38954	<u>Salmonella typhimurium</u> 197-2
38954	<u>Serratia narcescens</u> 338-1
38954	<u>Enterobacter agglomerans</u> 9381 NCTC
<u>Klebsiella</u> 1532	<u>Salmonella typhimurium</u> 197-2
1532	<u>Serratia narcescens</u> 338-1
1532	<u>Enterobacter agglomerans</u> 9381 NCTC
<u>Proteus rettgeri</u> 416-3	<u>Salmonella typhimurium</u> 197-2
416-3	<u>Serratia narcescens</u> 338-1
416-3	<u>Enterobacter agglomerans</u> 9381 NCTC

Da keiner der pigmentierten Stämme auf dem Selektivnährboden gewachsen war, wurde nur bei den phänotypisch nicht unterscheidbaren Klonen eine Identifikation und Resistenzbestimmung durchgeführt.

Bei den durchgeführten TMP-Resistenzübertragungsversuchen konnte in keinem Fall eine erfolgreiche Transmission nachgewiesen werden.

D I S K U S S I O N

Trimethoprimresistenz im Blättchentest.

Verbreitung bei Enterobacteriaceae und S. aureus.

Aus den zwischen 1970 und 1972 angestellten Erhebungen über die TMP-Resistenz geht hervor, daß das Resistenzverhalten von Vertretern der Gattungen Proteus, Enterobacter, Citrobacter und S. aureus ansteigt, die TMP-Resistenz bei E. coli und den Klebsiellen jedoch in viel geringeren Prozentsätzen ohne sichere Anstiegstendenz auftritt. Da sich unsere Untersuchungen des Jahres 1970 und 1971 lediglich auf ein ausgewähltes Keimmaterial erstrecken, wobei DST-Agar verwendet wurde, während 1972 die TMP-Resistenz im Multodiskstern und Mueller-Hinton Agar festgestellt wurde, erscheint ein direkter Vergleich des TMP-Resistenzverhaltens der Stämme zwischen den einzelnen Jahren nur unter Vorbehalt angebracht. Im Vergleich unserer Werte mit denen anderer Autoren läßt sich häufig Übereinstimmung feststellen.

Bei den nachfolgenden zum Vergleich herangezogenen Untersuchungen entstammen die Keime durchweg humanmedizinischem Untersuchungsmaterial; die TMP-Blättchen im Sensibilitätstest waren ebenso wie die von uns verwendeten mit 1,25 µg TMP/ml beschickt. Bei E. coli ist bisher über folgende TMP-Resistenzhäufigkeiten berichtet worden. LACEY et al. (1972) fanden 1,1 % TMP-resistente E. coli auf DST-Agar mit Zusatz von 5 Vol. % lysiertem Pferdeblut. FLEMING et al. (1972) fanden schon 1971 1,15 % TMP-resistente E. coli. TAUCHNITZ u. TATTERMANN (1972) fanden 2 % TMP-resistente E. coli auf Hefeextraktagar mit 5 Vol. % lysiertem Pferdeblut. LEBEK (1972) fand 6,5 % TMP-resistente E. coli auf DST-Agar Oxoid mit Zusatz von 5 Vol. % lysiertem Pferdeblut. LEGLER (1971) fand 0,37 % ebenfalls auf DST-Agar Oxoid. GANCZARSKI et al. fanden keinen TMP-resistenten E. coli-Stamm auf Wellcotest Sensivity Test Agar.

Von 1970 berichten LEWIS und LACEY (1973) über 2,3 % TMP-resistente E. coli auf DST-Agar Oxoid mit ebenfalls 5 Vol. % Pferdeblutzusatz. Wir fanden 1970 1,35 %, 1971 2,54 % und 1972 1,88 % TMP-resistente E. coli-Stämme.

Auf Grund der Beobachtungen von FLEMING - 2 Jahre vor der therapeutischen Anwendung von TMP - der schon 1966 1 % TMP-resistente E. coli aus Urin bei Harnwegsinfektionen isoliert hat, kann man im Vergleich zu den jüngsten Beobachtungen feststellen, daß die TMP-Resistenzhäufigkeit nicht wesentlich zugenommen hat.

Weniger Übereinstimmend sind die Beobachtungen der TMP-Resistenz bei den Klebsiellen. Hier fanden LACEY et al. (1972) z. B. nur 0,69 % und LEGLER (1971) nur 0,83 % TMP-resistente Keime, während FLEMING et al. (1972) 24,8 % fanden. TAUCHNITZ und TATTERMANN fanden 1972 12 % TMP-resistente Klebsiellen, LEGLER (1972) etwa 25 %. Wir fanden im gleichen Jahr etwa 30 % TMP-resistente Klebsiellen, 1970 etwa 11 %, 1972 17,1 %.

Für Proteus mirabilis geben TAUCHNITZ und TATTERMANN (1972) etwa 32 % TMP-resistente Stämme an, während wir im gleichen Jahr etwa 50 % aller Proteus-Stämme mit TMP-Resenzeigenschaft fanden. Der prozentuale Unterschied dürfte im wesentlichen dadurch bedingt sein, daß gerade P. mirabilis TMP-empfindlicher ist, als andere Vertreter der Gattung Proteus, wie z. B. P. rettgeri, P. morganii und P. inconstans (KNOTHE 1973; RAUTER 1971).

Eine besondere Stellung nimmt P. aeruginosa ein, die gegen TMP primär resistent ist (BUSHBY und BARNETT 1967, DARRELL et al. 1968, LEBEK und WIEDEMER 1971, GANCZARSKI et al. 1972). Dies beruht nach FOWLE (1968) darauf, daß, obwohl die Affinität des TMP zur Dihydrofolatreduktase der P. aeruginosa ebenso groß ist wie zu dem gleichen Enzym anderer TMP-sensibler Bakterien (BURCHALL und

HITCHINGS 1965), das TMP nicht vollständig durch die Zellmembran der Pseudomonaszelle gelangt.

Bei den nachfolgenden zum Vergleich herangezogenen Untersuchungen der S. aureus, entstammen die Keime ebenfalls durchweg humanmedizinischem Untersuchungsmaterial, jedoch sind die verwendeten Sensibilitätstestblättchen mit unterschiedlichen TMP-Konzentrationen beschickt gewesen, so daß die großen Unterschiede der Prozentsätze in dieser Methodenvariante ihre Erklärung finden können. So fanden TAUCHNITZ und TATTERMANN (1972) keinen TMP-resistenten Stamm ebenso wie LEGLER (1971). Im Gegensatz dazu berichten LEBEK und WIEDEMER (1971) von 25 % TMP-resistenten S. aureus gegenüber 1,25 µg TMP/ml auf dem Testblättchen. NAKHLA beschreibt 1972 unter 675 getesteten Stämmen ein TMP-Resistenzvorkommen von 1,6 % auf DST-Agar mit 5 Vol. % lysiertem Pferdeblut, wobei jedoch die TMP-Testblättchen mit 2,5 µg TMP/ml beschickt waren. LEWIS und LACEY (1973) finden 1970 in Bristol 1,0 % TMP-resistente S. aureus, deren MHK aber größer oder gleich 6,5 µg TMP/ml war. BUCKLE (1973) berichtet, daß er im Frühjahr 1964 unter 466 S. aureus ca. 8,5 % Stämme gesehen hat, die in Anwesenheit von 1 µg TMP/ml auf Medium mit lysiertem Pferdeblut noch wuchsen, ca. 1,7 %, die unter Anwesenheit von 2 µg TMP/ml noch wuchsen und ca. 0,43 %, die unter Anwesenheit von 5 µg TMP/ml noch wuchsen. Wir fanden 1970 ca. 1,7 %, 1971 und 1972 ca. 10 % TMP-resistente S. aureus. Unter diesem Aspekt kann auch bei den S. aureus keine signifikante Steigerung der TMP-Resistenzhäufigkeit festgestellt werden.

Beziehung zwischen Sulfonamid- und Trimethoprimresistenz.

Die Trimethoprimresistenz Eigenschaft ist bisher immer mit einer anderen Resistenz Eigenschaft gemeinsam aufgetreten; am häufigsten mit der Sulfonamidresistenz (vgl. Tab. 5 und 6). Da die Substanz in der Therapie mit dem Sulfonamid

Sulfamethoxazol angewendet wird, liegt eine vergleichende Betrachtung mit der Sulfonamidresistenz nahe.

Die Werte von RAUTER (1971) mit 46,2 % G-resistenten E. coli-Stämmen und 67,7 % G-resistenten Proteus-Stämmen und der Wert von LEBEK (1972) mit 45,7 % für G-Resistenz-determinanten tragende E. coli-Stämme liegen etwas unter den von uns gefundenen Werten. Die Ergebnisse von LEGLER (1971) mit etwa 21 % G-resistenten E. coli-Stämmen liegen noch etwas niedriger, während die von uns beobachtete Häufigkeit G-resistenter Proteus-Stämme etwas über den oben genannten Größenordnungen liegt (vgl. Tab. 4).

Einfluß des Nährmediums auf die Sensibilitätsprüfung.

Antagonisten der Trimethoprim-Hemmwirkung.

Um die Hemmwirkung von SMZ und TMP zu testen, sollte grundsätzlich ein möglichst antagonistenfrees Nährmedium benutzt werden.

Zur Frage des TMP-Antagonismus konnten zunächst keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden. FRENKEL u. HITCHINGS (1957), HITCHINGS u. BURCHALL (1965), BUSHBY u. HITCHINGS (1968) haben dargestellt, daß Mikroorganismen, die Folsäure synthetisieren, unfähig sind, exogene Folsäure zu utilisieren. In Übereinstimmung dazu beschreibt BÖHNI (1969 b), daß die TMP-Hemmwirkung durch die Gabe von Leucovorin (Tetrahydrofolat) nicht aufgehoben werden kann. BUSHBY u. HITCHINGS (1968) konnten bei Enterobacteriaceae, die auf exogene Folsäure angewiesen sind, eine Umkehr der Sensibilitäten bzw. TMP-Resistenz unter der Gabe von Leucovorin feststellen. GALLIEN (1973) konnte die Wirkung von TMP mittels hoher Konzentrationen 5-Formyl-FAH₄ bei S. aureus und P. fluoreszens teilweise hemmen. Im Laufe der Verwendung von TMP wurde von zahlreichen Autoren unabhängig voneinander festgestellt, daß die

Hemmwirkung von TMP durch die Anwesenheit bestimmter Metaboliten aus dem Biosyntheseweg der Bakterienproteine und Nukleinsäuren mehr oder weniger zu beeinflussen ist. Als TMP-Antagonisten werden Thymin, Thymidin, Thymidin-5-monophosphat, RNA, Vitamin B₁₂, aromatische Aminosäuren z. B. Tyrosin und einige ihrer Vorstufen Shikimisäure, bzw. Indol, Serin, Tryptophan, Aminosäuren der Asparat-Familie, Histidin und p-Aminobenzoessäure angegeben. p-Aminobenzoessäure verstärkt in relativ hohen Konzentrationen die antibakterielle Effektivität von TMP/SMZ und anderen Sulfonamiden (BUSHBY u. HITCHINGS 1968, DALE u. GREENBERG 1971, MIOVIC u. PIZER 1971, KOCH u. BURCHALL 1971, BARKER et al. 1972, SEYDEL et al. 1972, GALLIEN 1973, PINNEY u. SMITH 1973, LINZENMEIER 1973, DAHLHOFF 1973).

Sulfonamid-Antagonisten.

Als Sulfonamidantagonist ist die p-Aminobenzoessäure gut bekannt, aber auch unspezifische Faktoren, z. B. im Pepton können die Sulfonamidhemmwirkung antagonisieren. Nach den Erkenntnissen von MILLER et al. (1972) u. BOCK et al. (1973), die feststellten, daß die p-Aminobenzoessäure nicht nur rein kompetitiv durch die Sulfonamide gehemmt wird, ist nun auch die Dihydrofolsäure als Antagonist zu diskutieren. Die Autoren konnten feststellen, daß Sulfonamide zusätzlich in ein Folatanalogen eingebaut werden. Die Hemmung des Bakterienwachstums durch Sulfonamide wird sowohl durch eine Reduzierung der Dihydrofolsäure-Synthese, als auch durch den Verbrauch an Dihydropyrimidin-Alkohol herbeigeführt.

Es wird daher empfohlen (LINZENMEIER 1973), einen Fleischwasseragar mit einem armseligen Pepton, etwa Fibrin, zu benutzen. Außerdem ist beim Suspendieren der Keimeinsaat darauf zu achten, daß ein antagonistenfrees Medium verwendet wird (siehe auch AUWÄRTER 1973).

Wenn bei der Empfindlichkeitsprüfung blut hinzugefügt werden soll, so empfiehlt GALLIEN (1973) Humanblut den Hammel-, Rinder- oder Pferdeblut aufgrund besserer Hemmhofgrenzen vorzuziehen. Hierzu beschreiben BACH et al. (1973) im Vergleich zu Mueller-Hinton-Agar einen deutlichen Vorteil in Trypticase-Soy-Agar.

Biochemische Basis des Trimethoprimantagonismus.

Der Antagonismus hängt von der Aktivität der Thymidilatsynthetase ab, die bei der Gabe der entsprechenden Substanzen gehemmt oder umgangen wird. (DALE und GREENBERG 1971, MIOVIC und PIZER 1971, PINNEY und SMITH 1973). Bei Thy⁻ E. coli Mutanten, d. h. Stämmen, die exogenes Thymin zum Wachstum benötigen, ist die Thymidilatsynthetase bzw. die FAH₂-Reduktase gar nicht mehr aktiv, wodurch TMP keinen Angriffspunkt hat. Diese Stämme können als primär TMP-resistent bezeichnet werden. Solche TMP-resistenten, thyminbedürftigen Mutanten sind sowohl, nach TMP/SMZ-Therapie (PINNEY und SMITH 1973, LACEY und LEWIS 1973) als auch ohne Therapieeinfluß (THOMAS und DJIEJKO 1974) isoliert worden.

In Übereinstimmung mit KOCH und BURCHALL (1971) erklärt DAHLHOFF (1973), daß selbst hohe Thymidinkonzentrationen die antibakterielle Effektivität nicht vollständig aufheben. SEYDEL (1973) bestätigt die Ergebnisse von KOCH und BURCHALL (1971), die eine 50 %-ige Aufhebung der TMP-Aktivität durch Thymidin in aminosäure- und vitaminhaltigen Medien ermittelten. Sie mußten jedoch auch feststellen, daß über 5 µg Thymidin/ml keine weitere Aktivitätsminderung von TMP mehr beobachtet werden konnte. Der Grad der TMP-Wirkung in einem komplexen Medium dürfte mit der Thymidinkonzentration korrelieren, die das Medium enthält.

Die Eignung verschiedener Medien zur Feststellung
der Trimethoprimhemmwirkung.

Die größte TMP-Aktivität konnten die Autoren in Minimal Broth Peptone Difco; Proteose Peptone, Difco; Nutrient Broth, Wellcome; Sensivity Test Broth, Oxoid und Tryptic Soy Broth, Difco feststellen, während Tryptic Soy Broth, BBL; Tryptic Soy Broth, Oxoid; Difco Penassy Broth und Antibiotic Assay Broth, BBL wegen ihres hohen Thymidingehaltes unvergleichbar schlechter zu verwenden waren.

BARKER et al. (1972) empfiehlt als thyminarmes Medium Sensivity Test Agar Wellcotest.

Der von WATERWORTH (1969), HUNTER (1970), TIESLER (1970), LEBEK u. WIEDEMER (1971) und RITZERFELD (1972) verwendete DST-Agar-Oxoid wird auch heute noch zur Sensibilitätsprüfung von TMP und SMZ von GALLIEN (1973), LINZENMEIER (1973), KNOTHE (1973) und AUWÄRTER (1973) empfohlen.

Im Gegensatz dazu wird bei dem von der WHO empfohlenen Mueller-Hinton-Agar über unterschiedliche Ergebnisse berichtet. So wird von TIESLER (1971), ERICSEN u. SHERRIS (1971), und TAUCHNITZ u. TATTERMANN (1972) darauf hingewiesen, daß sie in ihren Untersuchungen Antagonisten gegen Sulfanilamide im Mueller-Hinton Medium fanden, die einen Gebrauch für Antibiotikatestung ungeeignet erscheinen lassen. DORNBUSCH (1971) und GALLIEN u. SCHÖNFELD (1971) verwendeten zur Kombinations-testung im Blättchentest Mueller-Hinton-Agar, kamen jedoch nicht zu übereinstimmenden Ergebnissen. BACH (1973) dagegen empfiehlt vor allem für die Sensibilitätsprüfung bei Neisseria und H. influenza einen modifizierten, thymin-freien MH-Agar. GALLIEN (1973) beschreibt die Mueller-Hinton-Nährböden von BBL, Oxoid, Merck und Difco als unterschiedlich sowohl in ihrem Aussagevermögen bezüglich der Disk-Testung als auch des antibakteriellen Wirkungs-

grades. KNOTHE und DAHLHOFF (1973) sind der Auffassung, daß Mueller-Hinton-Agar zur Kombinationstestung von TMP/SMZ ungeeignet ist, wenn überhaupt, dann sei der Mueller-Hinton-Agar von Merck wesentlich besser geeignet, als der von Difco.

Auch wegen seines nicht sehr konstanten Stärkegehaltes und wechselnden Glucosegehaltes können bei der Verwendung von MH-Medium bei der Testung falsche Resultate entstehen. Nach DAHLHOFF (1973) zeigen sowohl TMP als auch SMZ bei Verwendung von 1 % Glucose im Medium keine wachstums-hemmenden Effekte, wobei er darauf hinweist, daß Glucose einen osmotischen Schutz darstellt und damit die Bakterien vor der Lysis schützen könnte. Hier empfiehlt er, statt der erhöhten Glucosekonzentration Natriumacetat - wie in Oxoid-Medien - hinzuzufügen.

Für unsere routinemäßige Resistenzprüfung wurde bis Dezember 1971 DST-Oxoid-Agar verwendet. Seit 1972 wurde der Routinebetrieb auf den von der WHO empfohlenen Mueller-Hinton-Agar umgestellt. In der vorliegenden Untersuchung wurde sowohl DST-Oxoid-Agar und Mueller-Hinton-Agar, Oxoid, sowie Mueller-Hinton Broth, Oxoid, Tryptic-Soy-Agar, Difco, Tryptic-Soy-Broth, Difco und Ammoniumglucose-Medium verwendet. Bei einem Vergleich dieser Medien zeigten sowohl das Ammoniumglucose-Medium als auch MHB unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der TMP-Hemmwirkung, während sich die anderen Medien und Nährböden durch gute Übereinstimmung der Resultate bei unseren Untersuchungen als brauchbar erwiesen.

Bedeutung von Trimethoprim-Antagonisten in vivo.

Für die in vivo-Wirksamkeit des TMP erhebt sich nun die Frage, ob im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten wirk-same Thymidinkonzentrationen oder Äquivalente vorhanden sind, wodurch eine Hemmung beeinflußt werden könnte. Während KOCH und BURCHALL (1971) kein Thymin in körper-

eigenen Geweben finden konnten, ist BUSHBY (1973) der Auffassung, daß Thymin in Säugern in nicht genügend hoher Konzentration anwesend ist, um die in vivo-Aktivität von TMP zu beeinflussen. THEN und ANGEHRN (1974) fanden im Blut und Urin von gesunden Personen Thymin- und Thymidinkonzentrationen unter 0,1 bzw. 0,05 µg/ml, zu wenig, um einen bakteriziden Effekt aufzuheben. Die Möglichkeit eines Konzentrationsanstieges während einer Infektion schließen THEN und ANGEHRN (1974) ebenso wie LACEY und LEWIS (1974) nicht aus, da aber Thy⁻ Mutanten bisher kaum isoliert wurden, mißt er dieser Tatsache für die klinische Therapie nur wenig Bedeutung bei. THOMAS und DZIEKO (1974) beschreiben im Gegensatz dazu, daß sie und auch BARKER et al. (1972) eine Menge solcher Thy⁻ Stämme untersucht haben, und daß es nicht notwendig erscheint, daß Patienten vorher mit der Kombination TMP/SMZ behandelt wurden.

Diffusion und Löslichkeit von Trimethoprim und Sulfamethoxazol.

GALLIEN und SCHÖNFELD (1971) widersprachen aufgrund ihrer Ergebnisse der Empfehlung des WHO Expertenkomitees (1961), Diffusionstests nicht mit Kombinationen im Blättchentest durchzuführen, da sowohl TMP als auch SMZ hinreichend gleiche Diffusionseigenschaften in Agar-Medien erfüllten. Im Übrigen laufe durch den "Sequenzialeffekt", wobei die Wirkung des einen Antibiotikums die Wirkung des anderen Antibiotikums positiv beeinflusst, im Gegensatz zu den bisherigen Antibiotikakombinationen, ein andersartiges antibakterielles Wirkungsprinzip ab. Auch LINZENMEIER (1973) ist für eine Testung der Kombination im Agardiffusionsblättchentest, während sich MARGET (1973) und auch KNOTHE (1973) für die Testung der Einzelkomponenten aussprechen.

Synergismus von Trimethoprim und Sulfamethoxazol.

Hemmhofvergrößerungen im Blättchentest.

Bei der Blättchentestung fiel zunächst auf, daß die Hemmhöfe der Kombination größer waren als bei den Einzelsubstanzen. Diesbezüglich haben HITCHINGS u. BUSHBY (1961) schon von der Tatsache gesprochen, daß TMP die antibakterielle Wirkung von SMZ potenziert. BUSHBY und BARNETT (1967) berichten, daß TMP 10-20 mal aktiver ist als SMZ, die Wirkung unter Gegenwart von SMZ nochmals um das 6-20-fache ansteigt. Ähnliche Beobachtungen von BÖHNI (1969 b) bestätigen dies. Weiterhin beschreibt BÖHNI (1969 b), daß die TMP-Wirkung durch die Anwesenheit von SMZ meist stärker beeinflußt wird als SMZ durch TMP. 95 % der von ihr untersuchten Stämme, die gegen beide Substanzen einzeln empfindlich waren, zeigten aufgrund der Kombinationswirkung eine Hemmhofvergrößerung. GALLIEN und SCHÖNFELD (1971) zeigten an einem empfindlichen E. coli-Stamm, daß die addierten Einzelwirkungen von TMP (32,8 %) und SMZ (20,0 %) lediglich 52,8 % der Wirkung von SXT ergeben. Es verbleibt ein imaginärer Anteil von 47,2 %, dessen Ursprung im gleichzeitigen Wirken von TMP und SMZ zu suchen ist.

Die Frage nach dem Potenzierungseffekt, bzw. einer verbleibenden Wirkung der Kombination bei Vorliegen von Resistenz gegen eine der beiden Einzelsubstanzen, findet durch die Ergebnisse von BÖHNI (1969 b) und GALLIEN u. SCHÖNFELD (1971) in Übereinstimmung mit den unseren folgende Antwort: Die meisten Enterobacteriaceae, die Resistenz gegen eine der beiden Einzelsubstanzen aufweisen, zeigen bei Anwendung des Kombinationsblättchens noch eine Hemmhofvergrößerung, die jedoch immer geringer ist als bei Vorliegen von Sensibilität gegen beide Substanzen. In Übereinstimmung mit BUSHBY (1969) berichten LEBEK und WIEDEMER (1971) speziell von R-Trägerkeimen mit G-Resistenzdeterminanten, die im Vergleich zu sensiblen

Stämmen weniger empfindlich gegen die Kombination waren.

GALLIEN (1973) beschreibt einen Enterokoccus-Stamm, der wie alle Enterokokken primär Sulfonamid-resistent ist, und bei dem trotz der SMZ-Resistenz bei dem Kombinationsblättchen gegenüber dem TMP-Einzelblättchen eine Hemmhofvergrößerung von ca. 70 % nachweisbar war. Auch KNOTHE (1973) berichtet von einem hoch Su-resistenten E. coli-Stamm, der TMP-empfindlich ist und im Blättchentest gegenüber der Kombination eine leichte Vergrößerung der Hemmhöfe aufweist. GANCZARSKI et al. (1972), BACH et al. (1973) und BUSHBY (1973) finden in ihren Untersuchungen ebenfalls trotz SMZ-Resistenz, deutlichen Synergismus gegenüber der Wirkstoffkombination. Eine Antwort hierauf gibt SEYDEL (1973), der auch bei solchen Stämmen eine experimentell nicht nachweisbare Restaktivität des Sulfonamids unterstellt, wodurch in der Kombination diese kleine Reduktion der Synthese der Dihydrofolsäure eine Potenzierung der TMP-Wirkung verursacht.

Eine populationsanalytische Erklärung für das von BÖHNI (1969 a) beschriebene und auch von uns beobachtete Phänomen der Wirkungsverstärkung für den Fall, daß Keime gegen beide Einzelsubstanzen resistent sind, ist bisher nicht beschrieben worden. BÖHNI (1969 a) fand dies bei 9 % der von ihr untersuchten Enterobakterien, während wir bei einem E. coli-Stamm, bei 2 Proteus-Stämmen, einem Klebsiella-Stamm, 2 S. aureus-Stämmen und bei einem P. aeruginosa-Stamm diese Eigenschaft beobachten konnten. Umfangreiche Untersuchungen u. a. von BACH et al. (1973) und GALLIEN (1973) haben gezeigt, daß der synergetische Effekt, wie auch die Effekte der Einzelsubstanzen von großer Artspezifität sind.

Häufigkeit der Resistenz gegenüber der Trimethoprim/
Sulfamethoxazol-Kombination im Blättchentest.

Durch das Auftreten solcher Wirkungseigenschaften der TMP/SMZ-Kombination ist die Resistenzhäufigkeit bei den

Enterobacteriaceae in den letzten Jahren mit folgenden Prozentsätzen angegeben worden:

BÖHNI (1969 a) 26 %, ROBERTSON (1969) 6 %, SIMMONS (1970) 15 %, TIESLER (1970) 10 %, HUNTER (1970) 7 %, LEGLER (1971) 5,3 %, TAUCHNITZ u. TATTERMANN (1972) 5 %, RITZERFELD (1972 a) 10 %, GANCZARSKI (1972) 15,5 %, AUWÄRTER (1973) 16 %, LINZENMEIER (1973) 5 %, FRITSCH (1973) 25,5 %, GUTKOWSKA et al. (1973) 13,5 %, MARIANI et al. (1973) 13 %, MEYER-ROHN u. LIEHR (1973) 8,6 %.

Bei den S. aureus sind die Ergebnisse sehr unterschiedlich und die Resistenzhäufigkeit gegen die Kombination wird u. a. mit folgenden Prozentsätzen angegeben: LEGLER (1971), TAUCHNITZ u. TATTERMANN (1972), GUTKOWSKA et al. (1973) und LINZENMEIER (1973) fanden keinen resistenten Stamm. LEBEK und WIEDEMER (1971) dagegen ca. 25 % resistente S. aureus, MARIANI et al. (1973) 7,2 %, MEYER-ROHN und LIEHR (1973) 6,3 % und AUWÄRTER (1973) ca. 4,5 %.

Da die Empfindlichkeitsprüfung gegenüber der TMP/SMZ-Kombination wegen der Variabilität der Resultate in Abhängigkeit von den Testmedien problematisch ist, lassen die oben genannten Befunde weder bei den Enterobacteriaceae noch bei den S. aureus ein signifikantes Ansteigen der Resistenz gegenüber der TMP/SMZ-Kombination erkennen.

Im Hygiene-Institut der Universität Marburg wurde die Empfindlichkeit gegenüber der Kombination nicht routinemäßig getestet, da nur die Testung der Einzelsubstanzen eine rationale Chemotherapie ermöglicht. Aufgrund der benachbarten Anordnungen von Trimethoprim und Sulfonamid auf dem Multodisk-Stern ist nicht selten zusätzlich der Synergismus zwischen diesen beiden Substanzen zu sehen.

Potenzierungseffekt in flüssigen Medien.

SEYDEL et al. (1972) haben in bakterienkinetischen Unter-

suchungen in flüssigen Medien - dextrose-salts-casamino acids, vitamin-frei- (vgl. ANTON 1960) - deutlich zeigen können, daß beim gemeinsamen Wirken von TMP und SMZ mehr als nur ein additiver Hemmeffekt eintritt, da nach Zugabe beider Substanzen die erhaltene Keimzahlreduktion ohne Zweifel größer ist als sie durch einfache additive Wirkung der beiden Einzelsubstanzen erwartet werden kann.

In den von uns durchgeführten Agardiffusionsuntersuchungen verwendeten wir Mueller-Hinton Agar, Oxoid und DST-Agar, Oxoid und konnten keinen Einfluß des Mediums auf die Hemmhofgröße feststellen.

Von 36 geprüften E. coli zeigten nur 5 keine Hemmhofvergrößerung, sie waren alle SMZ-resistent. Alle übrigen von uns getesteten Stämme zeigten bei der Kombination eine Hemmhofvergrößerung. So auch bei weiteren 5 E. coli-Stämmen, 2 Proteus-Stämmen und einem Klebsiella-Stamm. Hemmhofvergrößerungen bei Resistenz gegen beide Einzelsubstanzen fanden wir gegenüber der Kombination bei einem E. coli-Stamm, 2 Proteus-Stämmen, einem Klebsiella-Stamm, 2 S. aureus-Stämmen und einem P. aeruginosa-Stamm.

Therapieempfehlung aufgrund der Sensibilitätsprüfungen in vitro.

Um die beiden Einzelsubstanzen oder deren Kombination therapeutisch zu verwenden, ist folgendes zu berücksichtigen.

1. Liegt Empfindlichkeit gegen beide Einzelsubstanzen vor, so ist bisher stets im Agardiffusionstest, sowie in flüssigen Kulturen, ein Potenzierungseffekt durch die Kombination beobachtet worden. Durch diesen Potenzierungseffekt empfiehlt es sich, ein Kombinationspräparat zu verwenden, da die zu applizierenden Dosen gering gehalten werden können. Sind die therapeutisch erreichten Plasmaspiegel oder Gewebsspiegel jedoch

nicht hoch genug oder ist die Keimzahl zu hoch für die aktuelle Wirkstoffkonzentration, so ist die Gefahr vor allem zunächst der G-Resistenzentstehung gegeben. Dies haben DARRELL et al. (1968) und WATERWORTH (1969) schon beobachtet.

2. Liegt SMZ-Resistenz und TMP-Empfindlichkeit vor, so tritt in den meisten Fällen noch ein Potenzierungseffekt bei Anwendung des Kombinationspräparates ein, und es können gute therapeutische Resultate erzielt werden.

WATERWORTH (1969), BUSHBY (1969), LEBEK UND WIEDEMER (1971), GANCZARSKI et al. (1972), SEYDEL et al. (1972), GALLIEN (1973), KNOTHE (1973), BACH et al. (1973) und BUSHBY (1973).

BUSHBY (1969), LEBEK und WIEDEMER (1971) und WATERWORTH (1969) erwähnen jedoch auch Fälle, bei denen hohe SMZ-Resistenz besteht und keine Potenzierung durch die Kombination mehr eintritt. Dann wäre die therapeutische Gabe eines Kombinationspräparates kontraindiziert, denn die antibakterielle Wirkung des TMP allein ist nur bei manchen Spezies eine bakterizide, so daß in dieser Situation möglicherweise TMP-resistente Mutanten entstehen (TAUCHNITZ und TATTERMANN 1972) oder Plasmiden, die TMP-Resistenz determinieren, übertragen werden können. Die zweite Möglichkeit einer TMP-Resistenzentstehung in vivo erscheint BUSHBY (1973) als die weniger bedeutsame. Im übrigen müßte TMP für den Zweck einer Monotherapie viel höher als im Kombinationspräparat dosiert werden, um einen Therapieerfolg bewirken zu können. In einer solchen Situation sollte auf ein anderes bakterizid wirkendes Antibiotikum zurückgegriffen werden.

3. Liegt TMP-Resistenz vor, so liegt nach unseren Ergebnissen (vgl. Tab. 5 u. 6) in den meisten Fällen, nach LEBEK (1972), auch immer G-Resistenz vor. Dennoch kann die Kombination beider Hemmstoffe MHK-Werte aufweisen,

die therapeutisch erreichbar sind (GALLIEN u. SCHÖNFELD 1971), bzw. in vitro Hemmhöfe erzeugen, die bei den Einzelsubstanzen, wie wir selbst sehen konnten, nicht auftraten (vgl. GALLIEN 1973).

Aufgrund dieser Möglichkeiten der Resistenzlage eines Keimes bezüglich TMP und SMZ und der Abhängigkeit der Testergebnisse von der Medienwahl, der Einseedichte, der Konzentration der Wirkstoffe und der Artspezifität (BACH et al. 1972, GALLIEN 1973), ist die Diskussion über die am besten geeignete Testmethode immer noch hoch aktuell. Wir sind aufgrund unserer Erkenntnisse und des theoretischen Wissens um die Wirkungsmechanismen der beiden Substanzen der Ansicht, daß es unverantwortlich ist, nur die Kombination zu testen, sondern empfehlen für den therapeutisch verantwortungsbewußten Hinweis die antibakterielle Wirkung der beiden Einzelsubstanzen zu testen.

Obwohl die TMP-Resistenz heute sehr selten ist und in den letzten Jahren kein signifikanter Anstieg beobachtet werden konnte, ist es dennoch dringend anzuraten, die TMP-Resistenzhäufigkeit auch in Zukunft genau zu beobachten. Insbesondere nach Langzeittherapie mit Kombinationspräparaten ist ein Anstieg der Resistenzhäufigkeit zu erwarten (BARKER et al. 1972; MAY u. DAVIES 1972; PINNEY u. SMITH 1973). Dies scheint nach Angaben von MAY in Übereinstimmung mit LEWIS u. LACEY (1973) vor allem bei der Behandlung chronischer Lungenerkrankungen vorzukommen, da SMZ in die Bronchialdrüsen weniger penetriert als TMP, so daß die Verteilung der zwei Drogen im Bronchialbaum weit von dem Idealverhältnis entfernt sein dürfte. Auch die Beobachtung, daß sog. "training cells" TMP-resistent werden, ist in diesem Zusammenhang zu erwähnen (DARRELL 1968; BUSHBY 1969, WATERWORTH 1969, vgl. S. 16).

Trimethoprimwirkung in flüssigen Medien.

Einfluß von Trimethoprim auf das Kulturverhalten.

In flüssigen Medien läßt sich die Hemmwirkung anhand der hemmstoffabhängigen Wachstumsraten und -erträge beschreiben. SEYDEL et al. (1972) konnten mit ihren bakterienkinetischen Untersuchungen zeigen, daß E. coli nach nur einer kurzen Latenz-Phase schon unter geringen TMP-Mengen deutlich reduzierte Wachstumsraten erkennen läßt. Neben diesem auch von uns beobachteten Phänomen, konnten wir außerdem zeigen, daß auch die Kulturerträge bei steigender TMP-Dosis geringer werden. Daneben fiel bei den TMP-sensiblen Kulturen ein kontinuierlicher Abfall der Wachstumserträge auf, während die Verringerung der Wachstumserträge bei TMP-resistenten Kulturen diskontinuierlich war. Dies deutet auf eine Resistenzdetermination hin, die von einem gewissen Schwellenwert ab aufgehoben ist.

Einfluß der Medienzusammensetzung auf den Trimethoprimereffekt.

DAHLHOFF (1973) berichtet über den Medieneinfluß von Mueller-Hinton Difco, Mueller-Hinton Difco modifiziert und Sensivity Test Broth Oxoid auf den TMP-Hemmeffekt, wobei in MH Difco modifiziert die größte Keimzahlreduktion nach 18 Std. gesehen wurde. In MH Difco war die Keimzahlreduktion am geringsten. STILLE (1973) empfiehlt aufgrund seiner Untersuchungen über die Abtötungskinetik ein antagonistenfrees "SR-Medium". In nährstoffreichen Medien wie Pennassay Broth kommt es beim Ampicillin zu einer wesentlich schnelleren Abtötung wie in Minimal-Medien. Nach STILLE (1973) ist die Kinetik des TMP mit der des Ampicillin vergleichbar.

SEYDEL et al. (1972) verwendeten für ihre entsprechenden Untersuchungen ein vitaminfreies dextrose-salts-casamino-

acids Medium, GALLIEN (1973) benutzte ein standardisiertes, flüssiges, antagonistenfrees Medium, BACH et al. (1972) beobachtete Staphylokokkenkulturen unter TMP-Einfluß in Mueller-Hinton Medium mit 2 %-igem lysiertem Pferdeblutzusatz.

Wir konnten beobachten, daß TMP in TSB und in MHB das Kulturwachstum fast in gleichem Maße beeinflusste, während die Hemmwirkung in Ammoniumglucose größer war. Dieser Effekt findet möglicherweise in dem Mangel an auxiliären Substanzen des Ammoniumglucose-Mediums seine Erklärung. Wenn auch die Kulturerträge der ungehemmten Kontrollen wesentlich niedriger sind als in den beiden anderen Medien, so weisen die lange Latenz-Phase, die verringerten Wachstumsraten und der niedrigere Kulturertrag im Vergleich zu den entsprechenden Kurven deutlich auf diese Tatsache hin.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der HK_{50} -Bestimmung bei E. coli 38954 und E. coli FDA lassen jedoch nicht zu, MHB der TSB als gleichwertiges Medium zur Seite zu stellen. Während bei dem TMP-sensiblen E. coli-Stamm FDA die HK_{50} -Bestimmung in allen drei untersuchten Medien in der gleichen Größenordnung liegt, sind die HK_{50} -Werte bei dem TMP-resistenten E. coli-Stamm 38954 in TSB und MHB unterschiedlich. Damit übereinstimmend berichtet GALLIEN (1973), daß MHB-Difco zur Bestimmung einer MHK im Röhrchensensibilitätstest im Vergleich zu DST-Oxoid-Medium ungeeignet war.

Bedeutung der HK_{50} -Werte.

Da wir Endpunktbestimmungen im Sinne einer MIC (MHK) für problematisch hielten, wählten wir den Vergleich der Hemmstoffkonzentrationen, die eine Reduktion des Kulturertrages um 50 % bewirken (vgl. auch FRASSINE 1975 - persönliche Mitteilung -). Die dennoch in Tab. 8 angegebenen MIC-Werte sind aufgrund der Methode, wie sie

ermittelt worden sind, nur größenordnungsmäßig mit denen anderer Autoren zu vergleichen, wobei sowohl bei den Enterobacteriaceae als auch bei S. aureus die Schwankungsbreiten für TMP-resistente und TMP-sensible Stämme gut mit den Ergebnissen von DATTA et al. (1972), LEBEK u. WIEDEMER (1971), FLEMING (1972), BUSHBY (1969), WATERWORTH (1969) und LACEY u. LEWIS (1973) u. a. übereinstimmen. Während die Größenordnung für TMP-sensible Stämme bei allen gleich ist, finden sich bei den TMP-resistenten Stämmen auch in unseren Ergebnissen der HK_{50} -Werte Unterschiede bis zu zwei Zehner-Potenzen. Dies läßt die Vermutung aufkommen, daß möglicherweise verschiedene Resistenzgene die TMP-Resistenz determinieren.

Temperatureinfluß auf die Trimethoprim-Hemmwirkung.

Latenz-Phasen.

Während SEYDEL et al. (1972) bei einem Kulturwachstum bei 37°C unter TMP-Einfluß eines E. coli bis 4 $\mu\text{g/ml}$ keine Latenz-Phase beobachtet hat, und wir auch bis 1 $\mu\text{g/ml}$ keine Latenz-Phasen feststellen konnten, traten diese bei unserem untersuchten E. coli-Stamm in Abhängigkeit zur Temperatur bei TMP-Konzentrationen von 10 bis 100 $\mu\text{g/ml}$ auf (Abb. 7).

Wachstumsraten.

Auch bei den Wachstumsraten konnten wir eine nicht lineare Zunahme bei steigender Temperatur erkennen (Abb. 8). Über 40°C stellten wir jedoch wieder eine deutliche Reduktion der Wachstumsraten fest.

Kulturerträge.

Die Kulturerträge zeigen eine geringe, aber den Wachstumsraten entsprechende Temperaturabhängigkeit (Abb. 9).

HK₅₀-Werte.

Ebenso gleichsinnig zeigt sich die Temperaturabhängigkeit der HK₅₀-Bestimmung, die im kalten Wachstumsbereich abnimmt, um im warmen Milieu wieder größer zu werden (Abb. 10).

Kulturverhalten.

Die Wachstumskurven, die bei dieser Untersuchung über 96 Std. registriert worden sind, zeigen z. T. einen biphasischen, z. T. einen mehrphasigen Verlauf, der auf eine Wirkungsabnahme des TMP in vitro schließen läßt. Nach dem Erreichen des Kulturertrages und dem darauffolgenden Kurvenabfall wird ein neues, höheres Maximum erreicht, dessen Niveau bis auf eine geringfügige Senke bis zum Versuchsende beibehalten wird (Abb. 5 u. 6).

Auch GALLIEN (1973) findet bei Salmonellen, und E. coli- und Proteus-Bakterien und BUSHBY (1973) bei Proteus einen ähnlichen Kurvenverlauf. Hierzu beschreibt SEYDEL (1973) einen "feed back" Mechanismus, der sich aus der Wirkungsweise des TMP ergibt. Wenn nämlich das Verhältnis TMP/Dihydrofolsäure aufgrund von Antagonistenanreicherung im Medium sich zu Ungunsten des TMP verschiebt, dann läßt die TMP-Wirkung durch den rein kompetitiven Antagonismus dieser beiden Substanzen an der Dihydrofolatreduktase allmählich nach, da diese kaum noch eine Bindung mit TMP eingeht.

Genetik der Trimethoprimresistenz.

Lokalisation der Trimethoprim-Resistenzdeterminante.

Die Frage nach der genetischen Lokalisation der TMP-Resistenz wird in einer Reihe neuerer Arbeiten behandelt. Die Ansichten, ob die TMP-Resistenz durch Mutation entsteht,

ob sie chromosomal oder extrachromosomal gebunden ist, gehen stark auseinander. Von primärer Bedeutung ist freilich die Frage, ob die Zellmembran beim Wildtyp einer Bakterienspezies für TMP überhaupt permeabel ist. Dies ist bekanntlich (FOWLE 1968) bei P. aeruginosa nicht der Fall. GALLIEN (1973) berichtet jedoch, die Zellmembranpermeabilität für TMP bei P. aeruginosa und Klebsiellae mit EDTA verbessert zu haben.

BERTINO u. STACEY teilen schon 1966 mit, daß Bakterien, die eine einfache Mutation erfahren und thy^- werden, damit primär TMP-resistent werden. Auch PINNEY u. SMITH (1973), LACEY u. LEWIS (1973), LEWIS u. LACEY (1973) und THOMAS u. DZIEJKO (1974) sind aufgrund ihrer Untersuchungen mit Keimen aus humanmedizinischem Untersuchungsmaterial der Ansicht, daß die TMP-Resistenz in Enterobacteriaceae chromosomal lokalisiert ist. LEWIS u. LACEY (1973) und NAKHLA (1973) zeigen in ihren Untersuchungen, daß auch in S. aureus die TMP-Resistenz aller Wahrscheinlichkeit nach chromosomal lokalisiert ist.

Im Gegensatz dazu sind DATTA et al. (1972), HEDGES et al. (1972) und FLEMING (1973) der Auffassung, daß Plasmiden verschiedener Verträglichkeitsgruppen existieren, auf denen die TMP-Resistenz determiniert ist. Die Untersuchung von FLEMING wurde diesbezüglich an Keimen aus veterinärmedizinischem Untersuchungsmaterial durchgeführt. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen sprechen ebenfalls mehr für eine plasmidgebundene Lokalisation der TMP-Resistenzdeterminante.

Eliminationsuntersuchungen.

Möglichkeiten zur Eliminierung eines R-Faktors.

Um festzustellen, ob die TMP-Resistenz auf einem Plasmid lokalisiert ist, versuchten wir mit Hilfe eines geeigneten DNA-Giftes die TMP-Resistenz Eigenschaft herauszulösen. Schon 1957 ist es HIROTA u. IJIMA gelungen, den F-Faktor aus F^+ -Zellen mit Akriflavin

herauszulösen. Seit 1961 ist bekannt, daß man mit Akridinfarbstoffen auch R-Faktoren aus Enterobacteriaceae herauslösen kann (MITSUHASHI et al. 1961 und WATANABE und FUKASAWA 1961). Die Eliminationsfrequenz war aber so niedrig, daß nach anderen geeigneten Stoffen gesucht wurde. So berichten schließlich HAHN und CIAK (1972), daß Ethidiumbromid unter 9 verschiedenen Substanzen am besten geeignet war, um aus E. coli R-Dterminanten zu eliminieren. Über den Chemismus des Ethidiumbromid teilen schon 1967 LEPECQ und PAOLETTI mit, daß Ethidiumbromid die RNA und DNA bindet und die zugehörigen DNA- und RNA-Polymerasen hemmt. Wie auch Akridinorange, so wird Ethidiumbromid zwischen die Basenpaare der Nukleinsäuren eingebaut. HAHN und CIAK (1972) berichten von 3 Modellen, die beschreiben, wie die Hemmung der DNA im Einzelnen stattfinden könnte. Warum die Hemmung jedoch nur bei extrachromosomalen Nukleinsäuren abläuft, ist noch nicht genau geklärt; möglicherweise besitzen diese DNA-Gifte zu den kleineren extrachromosomalen Ringen eine größere Affinität als zu den größeren Ringchromosomen (BOUANCHAUD et al. 1968, LEBEK 1972).

Gegenüberstellung von Eliminationsergebnissen mit Ethidium-Bromid.

Unsere Werte über die subinhibitorischen EB-Konzentrationen, die bei den Enterobakterien zwischen 60 und 100 μg EB/ml Medium und bei den S. aureus bei 1 μg /ml liegen, stimmen gut mit den von BOUANCHAUD et al. (1968) gefundenen Werten 2,3 - 3,9 μg /ml bei S. aureus und 23,7 - 985,8 μg /ml bei Enterobacteriaceae überein.

Da unsere Eliminationsergebnisse der TMP-Resistenz zwischen 0 % und 100 % liegen, kann keine endgültige Aussage gemacht werden, ob die TMP-Resistenz generell

durch EB herauslösbar ist. Der EB-Verlust ist jedoch wesentlich höher als der Spontanverlust der TMP-Resistenz beim gleichen Keim. Auch die vollständige Elimination der TMP-Resistenz bei E. coli 68495 und die 28 %-ige TMP-Resistenzelimination des E. coli 68489 weisen darauf hin, daß EB die TMP-Resistenz herauslösen kann.

Zusammen mit dem Verlust der TMP-Resistenz können wir über den gemeinsamen Verlust der Ampicillinresistenz, der Ciclacillinresistenz, der Streptomycinresistenz, der Tetracyclinresistenz und der Chloramphenicolresistenz berichten (vgl. Tab. 10).

Der Verlust der Chloramphenicol- und Penicillinresistenz, der gemeinsam mit dem TMP-Resistenzverlust bei S. aureus zu beobachten ist, stimmt mit den Ergebnissen von KAYSER et al. (1972) überein (vgl. Tab. 10).

Dynamik von Elimination und Reinfektion der Trimethoprim-Resistenzgene.

Der Nachweis, daß durch die Behandlung mit EB auch in flüssigen Medien ein vorher TMP-resistenter Keim eine HK_{50} im Bereich der sensiblen Vergleichsstämme aufweisen würde, gelang nur bei einem Stamm von E. coli (68489). Es ist daher anzunehmen, daß durch die Behandlung mit EB der größte Teil der Population die TMP-Resistenzeigenschaft verliert und dieser Verlust im Agar-Diffusionstest nachweisbar ist, da hierbei nur wenige Keime miteinander in Kontakt kommen. Bei der erneuten Kultivierung von der Resistenzplatte ins flüssige Medium wird den Keimen erneut Kontaktmöglichkeit gegeben und die wenigen, noch TMP-resistenten Organismen reinfizieren die sensibel gewordenen wieder.

Übertragungsversuche.

Um die Annahme der Reinfektionsmöglichkeit weiter zu bestätigen, wurde versucht, die TMP-Resistenz auf sensible Keime zu übertragen. Diese Übertragungsuntersuchungen sind uns jedoch in keinem Fall gelungen und auch BUSHBY (1969), WATERWORTH (1969), LACEY et al. (1972) und DATTA et al. (1972) ist bei ähnlichen Untersuchungen der Nachweis zunächst nicht geglückt.

LEBEK und WIEDEMER (1971) beschreiben erstmalig eine Übertragung von G-Resistenzfaktoren von E. coli auf E. coli K₁₂, die zusätzlich auch TMP-Resistenz determinieren. Diese TMP-Resistenz ist jedoch geringer als die natürlich vorkommende. Die gleichen Autoren haben keinen TMP-resistenten Enterobacteriaceae-Stamm ohne R-Faktor gefunden. FLEMING (1972) berichtet ausführlich über eine gelungene, gleichartige TMP-Übertragung von zwei TMP- und G-resistenten E. coli auf E. coli K₁₂. In beiden Fällen wurde die Resistenzeigenschaft gegen beide Substanzen übertragen. Außerdem gelang die Übertragung der TMP-Resistenz und der G-Resistenz auf Salmonella typhimurium. Ein TMP-resistenter Klebsiella-Stamm übertrug neben der SMZ- und TMP-Resistenz auch noch die Determinanten von Streptomycin, Tetracyclin und Chloramphenicol auf E. coli K₁₂. Die beiden E. coli-Stämme waren fi⁻, die Klebsiella fi⁺, die Übertragungsfrequenz betrug nach Inkubation über Nacht 10⁻⁷ Keime. Die MIC der resistenten Stämme für TMP lag in allen Fällen über 1000 µg/ml.

1972 können DATTA et al. praktisch in Anlehnung an die gemeinsamen Untersuchungen mit FLEMING (1972) über umfangreichere Untersuchungen zur Übertragung der TMP-Resistenz berichten. Diesen Untersuchungen wurden Erkenntnisse von LAWN et al. (1967) und ANDERSON (1968) zugrunde gelegt, die Verträglichkeiten bzw. Unverträglichkeiten von I-Pili produzierenden R-Faktoren feststellen konnten.

Mit Hilfe der von DATTA und HEDGES (1971) gefundenen Verträglichkeitsgruppe W bei Plasmiden in Enterobacteriaceae gelang es, durch Einführung eines solchen W Plasmids in hoch TMP-resistente Enterobacteriaceae, die TMP-Resistenz zu eliminieren. Daraus wurde der Schluß gezogen, daß die TMP-Resistenz auf einem neuen Plasmid der Gruppe W lokalisiert ist, wenn diese größer 1000 $\mu\text{g/ml}$ ist. Weiterhin gelang es, die TMP-Resistenz von 19 Wildstämmen von Enterobacteriaceae auf E. coli K₁₂ zu übertragen, wobei die G-Resistenz regelmäßig mitübertragen wurde. Bei sechs Übertragungen wurde neben diesen beiden Resistenzeigenschaften noch die R-Determinanten-Übertragung von Ampicillin, Streptomycin, Tetracyclin und Chloramphenicol beobachtet. Diese Stämme wurden als fi^+ Stämme identifiziert, während die übrigen 13 Stämme als fi^- Stämme erkannt wurden.

HEDGES und DATTA (1972) berichten vom Auftreten eines weiteren Plasmids, das neben der TMP-Resistenz die Resistenz gegenüber Streptomycin determiniert und einer neuen Verträglichkeitsgruppe B zugehört. Die gleichen Autoren stellen aufgrund ihrer Untersuchungen 1973 eine differenzierte Unterteilung der I-Pili determinierenden Plasmiden auf, wodurch solche R-Faktoren jetzt I_{α} , I_{γ} und I_{ω} benannt werden.

In ihren Untersuchungen 1973 über eine genaue Klassifizierung der I-Pili determinierenden Plasmiden, wird dieses Plasmid der Verträglichkeitsgruppe B der Gruppe I_{β} zugeordnet.

FLEMING (1973) bestätigt die Möglichkeit, R-Faktoren, die TMP- und Streptomycinresistenz determinieren, auf E. coli übertragen zu können.

Bei Stämmen, deren MIC kleiner 1000 μg TMP/ml Medium waren, gelang bisher noch keine Übertragung.

Die Übertragungsergebnisse von FLEMING (1972), DATTA und HEDGES (1971) und HEDGES und DATTA (1972) stehen in guter Übereinstimmung mit dem gemeinsamen Resistenzverlust in unseren Eliminationsuntersuchungen.

Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen stehen die Ergebnisse von PINNEY und SMITH (1973), denen nur die Übertragung von G-Resistenz-Faktoren, nicht aber auch die der TMP-Resistenz gelang. Auch LEWIS und LACEY (1973) konnten die Existenz von TMP-Resistenz determinierenden Plasmiden nicht bestätigen; in keinem Fall gelang die Übertragung der TMP-Resistenz, in 0,1 % gelang jedoch die TMP-Elimination durch Nitrosoguanidin. Die Autoren berichten ferner über hohe Mutationsraten bei Streptococcus faecalis unter Einfluß von TMP. Bei S. aureus wurde nach Bebrütung bei 43°C über 12 Std. in keinem Fall ein TMP Spontanverlust beobachtet. LACEY et al. (1972) haben aufgrund ihrer niedrigen Übertragungsquote der TMP-Resistenz bei S. aureus auch eher einen Hinweis für die chromosomale Lokalisation der TMP-Resistenz. NAKLAH (1973) konnte in seinen Untersuchungen die Ergebnisse von LACEY et al. (1972) bestätigen, indem er die TMP-Resistenz von einem zellfreien Phagensylat auf einen sensiblen S. aureus zunächst in einer Frequenz von $2,7 \times 10^{-7}$ übertrug, um die Frequenz unter UV-Einwirkung um das 4,5-fache zu steigern. Dieses Verhalten ist für die Übertragung chromosomaler Gene typisch (ARBER 1960). Eine gemeinsame Übertragung mit anderen Antibiotikaresistenzmarkern wurde nicht beobachtet. Die Übertragene TMP-Resistenz war temperaturstabil und nicht durch Akridinorange oder Ethidiumbromid eliminierbar.

Wie die Entwicklung der TMP-Resistenz und die Untersuchungen über deren Übertragung gezeigt haben, können möglicherweise verschiedene R-Typen die TMP-Resistenz in Enterobacteriaceae determinieren. Hier scheinen die TMP-Resistenzdeterminanten, die eine MIC 1000 $\mu\text{g/ml}$ determinieren, chromosomal lokalisiert zu sein, während

die über 1000 μg /ml Medium extrachromosomale Resistenzdeterminanten zu sein scheinen. Aufgrund der Kenntnisse über die bakterielle, infektiöse Resistenz, kommt der extrachromosomalen Lokalisation der TMP-Resistenz die weitaus größere klinische Bedeutung zu.

Bei den S. aureus ist bis heute keine TMP-Resistenzdeterminante mit solch hohen MIC-Werten (1000 μg /ml) entdeckt worden, so daß die Ergebnisse von LEWIS und LACEY (1973) und NAKLAH (1973) in diesem Zusammenhang übereinstimmen, und bei den S. aureus die TMP-Resistenzdeterminante als chromosomal lokalisiert angenommen werden kann. Auffallend ist auch, daß bei fi^- Stämmen bisher nur die Übertragung der Kombinationsresistenz TMP und G beobachtet worden ist, während bei fi^+ Stämmen noch andere Resistenzdeterminanten gemeinsam mit dem TMP-Resistenz tragenden R-Faktor in der Zelle zu sein scheinen. Die Gründe, warum derselbe R-Faktor im Organismus derselben Spezies und auch fremder Spezies unterschiedliche Resistenzhöhen determinieren kann, sind noch nicht bekannt (LEBEK 1972).

In dem Zusammenhang der MIC-Abhängigkeit ist am ehesten ein Grund dafür zu sehen, daß unsere Übertragungsversuche ebenso wie die anderer Autoren früherer Berichte erfolglos blieben, da die MIC-Werte der untersuchten Stämme alle unter 1000 μg /ml Medium liegen. Obwohl wir als Akzeptorstämme ebenso wie die erfolgreichen Autoren E. coli K₁₂ und S. typhimurium benutzten und wie von LEBEK (1969) und MISUHASHI (1971) empfohlen, die Mischkulturen belüftet wachsen ließen, scheint unsere Aussage der TMP-Resistenzübertragung nur von begrenztem Wert, da wir keine Untersuchungen darüber anstellten, ob unsere Donatorstämme fi^+ -Träger waren.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Die Vorkommenshäufigkeit der Trimethoprim (TMP)- und Sulfonamid (G)-Resistenz bei 3814 Bakterienstämmen aus der Familie der Enterobacteriaceae sowie 520 S. aureus-Stämmen, die während der Jahre 1970 bis 1972 im bakteriologischen Laboratorium des Hygiene-Instituts der Universität Marburg aus humanmedizinischem Untersuchungsmaterial isoliert worden waren, wurde im Agardiffusionsverfahren mit Blättchenbeladungen von 1,25 μ g TMP/ml und 100 μ g Sulfafurazol/ml ermittelt. Bei E. coli fanden sich im Mittel 1,59 % TMP-resistente und 58,8 % G-resistente Stämme ohne Anstiegstendenz; bei den Vertretern der Proteus-Gruppe stieg der Anteil der TMP-resistenten Stämme während des Berichtszeitraumes von 17,1 % auf 49,6 %, der Anteil der G-resistenten Stämme von 73,3 % auf 84,2 %. Der Anteil der TMP-resistenten Stämme nahm auch bei den Klebsiella von 7,1 % auf 17,1 %, bei den Enterobacter von 8,2 % auf 16,1 %, bei den Citrobacter von 3,3 % auf 18,7 % und bei den S. aureus von 1,7 % auf 10,5 % zu, ebenso konnte in allen Gruppen ein G-Resistenzanstieg bei Klebsiella von 6,1 % auf 71,1 %, bei Enterobacter von 65,7 % auf 73,2 %, bei Citrobacter von 40,0 % auf 42,3 % und bei S. aureus von 50,4 % auf 80,8 % ermittelt werden.

Bei Escherichia, Klebsiella und Enterobacter lag die TMP-Resistenz am häufigsten gleichzeitig mit der Sulfonamid- und Cephalotinresistenz vor. Bei Bakterien der Proteus-Gruppe war die TMP-Resistenz am häufigsten mit Unempfindlichkeit gegen therapeutische Konzentrationen von Colistin, Sulfafurazol und Tetracyclinen kombiniert. Bei den TMP-resistenten S. aureus Stämmen war Sulfonamidresistenz die häufigste weitere Resistenzeigenschaft.

Bei 31 von 36 aus der Familie der Enterobacteriaceae geprüften Stämmen konnte eine potenzierende Wirkung der

TMP/SMZ-Kombination im Agar-Diffusionstest nachgewiesen werden.

Der Einfluß von TMP auf alle Phasen eines Kulturwachstums in flüssigen Medien konnte gezeigt werden; um einen deutlichen Hemmeffekt hervorzurufen, muß jedoch bei TMP-resistenten Stämmen die TMP-Konzentration höher sein als bei TMP-sensiblen Stämmen.

Anhand des TMP-Effektes auf die turbidimetrische Wachstumskurve der Batch-Kultur wurde die Hemmstoffkonzentration, die noch 50 % des Kulturertrages der ungehemmten Kontrolle zuläßt (HK_{50}), als Maß für die TMP-Aktivität gegenüber im Blättchentest sensiblen bzw. resistenten Keimen verwendet, sowie beim Vergleich der TMP-Effekte in verschiedenen Kulturmedien. Die HK_{50} von TMP in Trypticase Soy Brühe betrug für sensible Vertreter von E. coli 0,37 μg TMP/ml, für im Blättchentest resistente Stämme von 2,5 - 16,5 μg TMP/ml; für sensible S. aureus-Stämme 0,49 μg TMP/ml, für resistente Stämme von 9,1 μg TMP/ml - 49,0 μg TMP/ml. Die HK_{50} ist somit als Maß für Hemmkonzentrationen mit üblichen MHK-Werten vergleichbar.

Der Einfluß der Medienzusammensetzung auf die TMP-Aktivität gegenüber Enterobacteriaceae erwies sich beim Vergleich komplexer Medien (Trypticase Soy Brühe, Mueller-Hinton Brühe) als gering unterschiedlich (Schwankungen der HK_{50} -Werte um 17,1 %), während in Ammonium-Glucosemedium eine erhebliche Wirkungsverstärkung (Abnahme der HK_{50} -Werte um 82,4 %) zu beobachten war.

Das Temperaturoptimum der TMP-Wirkung auf E. coli, Stamm 38954 in Trypticase Soy Brühe lag zwischen 30,2°C und 33,1°C, oberhalb und unterhalb des optimalen Bereiches war die Wirksamkeit von TMP geringer.

Bei TMP-resistenten E. coli Stämmen konnte Elimination während des Wachstums in Gegenwart subinhibitorischer

Konzentrationen von Ethidium Bromid um 28 % bis 100 % beobachtet werden. Die Spontanverlustrate des E. coli-Stammes 38954 betrug 6 %. Streptomycin-, Ciclacillin- und Ampicillin-Resistenz wurde co-eliminiert. Bei S. aureus wurde Chloramphenicol- und Sulfonamid-Resistenz co-eliminiert. Eine Übertragung der TMP-Resistenz auf einen plasmidenfreien E. coli K₁₂-Stamm gelang hingegen nicht.

Tabelle 1

Resistenzeigenschaften und Herkunft der in den Untersuchungen
verwendeten Bakterienstämme der Stammsammlung.

Spezies	Sammlungs- nummer	Quelle	Resistenz
<u>Enterobacteriaceae:</u>			
<u>Escherichia coli</u>	FDA	Food and Drug Ad- ministra- tion Washington	P,OB,Ci,S,
<u>Escherichia coli</u>	K ₁₂ ATTC 12435	American type cul- ture col- lection Rochville, Maryland	P,
<u>Salmonella typhimurium</u>	197-2	HIM: (sie- he Fußnote)	P,Ci,S,
<u>Citrobacter freundii</u>	266-2	HIM	P,Ci,KF,
<u>Klebsiella oxytoca</u>	321-6	HIM	P,PN,Ci,KF,G,
<u>Enterobacter aerogenes</u>	222-3	HIM	P,PN,Ci,KF,G,
<u>Enterobacter agglomerans</u>	NCTC 9381	National collection of type cultures, London	P,Ci,
<u>Serratia narcescens</u>	338-1	HIM	P,Ci,KF,CS,F,
<u>Proteus rettgeri</u>	416-3	HIM	P,PN,OB,Ci,KF, TE,C,G,W,PY,CS, S,F,
<u>Proteus mirabilis</u>	416-8	HIM	P,PN,Ci,TE,C,G, W,PY,S,K,CS,CN, NA.

Spezies	Sammlungs- nummer	Quelle	Resistenz
<u>Proteus inconstans</u>	236-2	HIM	P,TE,S,CS
<u>Micrococcaceae:</u>			
<u>Staphylococcus aureus</u>	SG 511	HIM	sensibel

HIM: Isoliert aus humanmedizinischen klinischen Materialien des Medizinischen Untersuchungsamtes am Hygiene-Institut der Universität Marburg.

Tabelle 2

Resistenzeigenschaften der in den Untersuchungen verwendeten Bakterienstämme aus klinischem Material.

Spezies	Sammlungsnummer	Versuchsnummer	Resistenz
<u>Enterobacteriaceae:</u>			
<u>Escherichia coli</u>		31333	P, Ci, G, S,
<u>Escherichia coli</u>	427-4	38954	P, OB, G, W, S,
<u>Escherichia coli</u>	453-3	39188	P,
<u>Escherichia coli</u>	435-3	68495	P, PN, Ci, KF, TE, G, W,
<u>Escherichia coli</u>	436-6	68489	P, PN, Ci, KF, TE, G, W,
<u>Escherichia coli</u>		1650	P, PN, Ci, TE, C, G, S,

Es wurden für die Untersuchung zur Frage der Hemmhofvergrößerung der TMP/SMZ-Kombination im Agardiffusionstest weitere 23 E. coli nur auf ihre TMP-, SMZ- und TMP/SMZ-Empfindlichkeit untersucht (vgl. Tab. 7).

<u>Klebsiella sp.</u>	435-6	1532	P, PN, Ci, TE, C, G, W, F,
<u>Klebsiella sp.</u>		65311	P, PN, Ci, KF, TE, C, G, W, PY, S, K, F,
<u>Klebsiella ozeana</u>		65633	P, PN, OB, G, W,
<u>Klebsiella sp.</u>		8737	P, PN, Ci, KF, G, G, PY, S,
<u>Klebsiella oxytoca</u>		7064	P, PN, Ci, PY, S,
<u>Klebsiella oxytoca</u>		5178	P, PN, Ci, TE, C, G, W, PY, S, K,

Spezies	Sammlungsnummer	Versuchsnummer	Resistenz
<u>Proteus inconstans</u>	453-4	7034	P, PN, Ci, KF, G, W, S, CS
<u>Proteus inconstans</u>		7037	P, PN, Ci, KF, G, W, CS, NA,
<u>Proteus sp.</u>		8358	P, C, S, K, CS, F,
<u>Enterobacter sp.</u>	435-2	4794	P, PN, Ci, KF, TE, G, W,
<u>Enterobacter sp.</u>	436-6	7844	P, KF, W,
<u>Enterobacter sp.</u>		4428	P, KF, G,
<u>P. aeruginosa</u>		68886	P, PN, OB, W, Ci, KF, TE, C, G, S, K, F, NA,
<u>Micrococcaceae:</u>			
<u>S. aureus</u>	435-5	4086	P, TE, C, G, W,
<u>S. aureus</u>	435-4	60746	P, C, G, W, E,
<u>S. aureus</u>	436-4	7835	P, PN, W,
<u>S. aureus</u>		6279	sensibel
<u>S. aureus</u>		0732	P, Ci, OB

Tabelle 3

Beziehung zwischen Transmission (578 nm, Blaustichröhrchen von 13 mm Dm.) und Bakterientrockensubstanz (80°C) bei spätexponentiellen Zellen von Escherichia coli (Nr. 47357/64, Trypticase Soy Broth)

T ₅₇₈ %	mg/ml	T ₅₇₈ %	mg/ml	T ₅₇₈ %	mg/ml
1		36	0,29	71	0,075
2	2,5	37	0,28	72	0,072
3	1,7	38	0,27	73	0,069
4	1,4	39	0,26	74	0,065
5	1,2	40	0,25	75	0,062
6	1,1	41	0,24	76	0,059
7	1,0	42	0,23	77	0,056
8	0,95	43	0,225	78	0,053
9	0,90	44	0,215	79	0,050
10	0,85	45	0,206	80	0,047
11	0,80	46	0,200	81	0,044
12	0,76	47	0,190	82	0,041
13	0,73	48	0,185	83	0,038
14	0,70	49	0,176	84	0,036
15	0,67	50	0,170	85	0,033
16	0,64	51	0,164	86	0,030
17	0,62	52	0,158	87	0,028
18	0,59	53	0,150	88	0,025
19	0,57	54	0,146	89	0,023
20	0,55	55	0,140	90	0,021
21	0,53	56	0,135	91	0,019
22	0,50	57	0,130	92	0,016
23	0,49	58	0,126	93	0,014
24	0,47	59	0,120	94	0,012
25	0,45	60	0,116	95	0,010
26	0,44	61	0,110	96	0,0080
27	0,42	62	0,108	97	0,0055
28	0,40	63	0,102	98	0,0040
29	0,39	64	0,100	99	0,0025
30	0,37	65	0,096		
31	0,36	66	0,093		
32	0,34	67	0,089		
33	0,33	68	0,086		
34	0,32	69	0,082		
35	0,30	70	0,079		

1/ Zellen gewaschen und resuspendiert in 0,85 % NaCl.
Küvettenhalter 115320 Photometer Eppendorf

Tabelle 4

Häufigkeit der TMP- und G-Resistenz bei Enterobacteriaceae und S. aureus im Agar-Diffusionstest 1970 - 1972.

	1970			
	Anzahl der geprüften Stämme	Häufigkeit in % aus klinischem Material	% der Stämme TMP-	% der Stämme G-
<u>E. coli</u>	511	45,2	1,35	59,0
<u>Proteus</u>	269	23,8	17,1	73,3
<u>Klebsiella</u>	126	11,2	7,13	6,1
<u>Enterobacter</u>	73	6,5	8,2	65,7
<u>Citrobacter</u>	30	2,7	3,33	40,0
<u>S. aureus</u>	117	10,4	1,71	50,4

Stämme insgesamt: 1126

	1971			
<u>E. coli</u>	728	46,6	2,54	56,2
<u>Proteus</u>	335	21,4	43,6	89,1
<u>Klebsiella</u>	202	13,0	30,1	66,4
<u>Enterobacter</u>	79	6,0	15,2	59,5
<u>Citrobacter</u>	13	0,8	15,4	69,2
<u>S. aureus</u>	203	13,0	9,8	56,2

Stämme insgesamt: 1560

	1972			
<u>E. coli</u>	731	44,3	1,88	61,2
<u>Proteus</u>	353	21,5	49,6	84,2
<u>Klebsiella</u>	152	9,2	17,1	71,1
<u>Enterobacter</u>	93	5,6	16,1	73,2
<u>Citrobacter</u>	19	1,2	18,7	42,3
<u>S. aureus</u>	200	12,1	10,5	80,8

Stämme insgesamt: 1648

Anmerkung: 1970 wurde die TMP-Resistenz nur an ausgewählten Stämmen geprüft.
 1971 wurde auf jede Platte ein einzelnes TMP-Testblättchen - Oxoid 1,25 µg/ml - am Rand aufgelegt.
 1972 Verwendung der Multidisksterne Code 3636 E.
 1970 und 1971 Verwendung von DST-Agar, Oxoid Div. Oxo Ltd. London.
 1972 Verwendung von Mueller-Hinton, Agar-CM 337, Oxoid Div. Oxo Ltd. London.

Tabelle 5

Gleiche Resistenzmuster von Trimethoprim-resistenten
Bakterienstämmen aus klinischem Material aus 1970
und 1971.

	P	PN	KF	TE	C	G	W	PY	S	K	CS	CN	F	NA	OB
<u>E. coli</u>	2x	P	PN	KF	TE	C	G	W	PY	S					OB
	2x	P	PN	KF				W							OB
	2x	P	PN	KF			G	W							OB
	3x	P	PN	KF	TE		G	W							OB
	9x	mehrfach auftretende Resistenzmuster; 16 weitere Resistenzmuster waren unterein- ander verschieden.													

<u>Proteus</u>	15x	P		TE		G	W				CS				OB	
	14x	P		KF	TE		G	W			CS		F		OB	
	12x	P		TE			G	W			CS		F		OB	
	10x	P		KF	TE		G	W			CS				OB	
	9x	P	PN	KF			G	W			CS				OB	
	6x	P	PN	KF			G	W			CS		F		OB	
	5x						G	W			CS				OB	
	5x	P		KF	TE		G	W			CS		F		OB	
	4x	P					G	W			CS				OB	
	3x	P		TE	C		G	W			CS				OB	
	3x	P	PN	KF			G	W			CS				OB	
	3x	P		TE			W				CS		F		OB	
	3x		KF				G	W			CS				OB	
	3x	P		KF	TE		G	W			CS		F		OB	
	3x	P	PN	KF	TE	C	G	W	PY	S	CS		F		OB	
	3x			TE			G	W			CS				OB	
	2x	P		KF	TE	C	G	W			CS				OB	
	2x	P		KF	TE	C	G	W		S	K	CS		F	OB	
	2x	P	PN	KF	TE	C	G	W		S	K	CS			OB	
	2x	P	PN	KF	TE	C	G	W		S		CS		F	NA	OB
	2x	P		TE	C	G	W			K	CS		F		OB	
	2x	P	PN	KF	TE	C	G	W		S	K	CS		F	NA	OB
	2x	P		KF	TE	C	G	W	PY			CS		F		OB
	2x	P	PN	KF				W				CS				OB
	2x	P		KF	TE	C	G	W				CS		F		OB

	P	PN	KF	TE	C	G	W	PY	S	K	CS	CN	F	NA	OB
2x	P	PN	KF	TE		G	W				CS				OB
2x	P					G	W	PY			CS				OB
2x	P	PN	KF	TE	C	G	W	PY	S	K	CS		F		OB
2x			KF			G	W	PY			CS				OB
<u>2x</u>	P		KF	TE	C	G	W			K	CS		F		OB

127x mehrfach auftretende Resistenzmuster;
59 weitere waren untereinander verschieden.

Klebsiella

8x	P	PN	KF			G	W	PY							OB
8x	P	PN	KF	TE	C	G	W	PY	S	K			F	NA	OB
6x	P	PN	KF	TE	C	G	W	PY	S	K				NA	OB
5x	P	PN				G	W								OB
4x	P	PN	KF			G	W								OB
3x	P	PN	KF			G	W					F			OB
3x	P	PN	KF		C	G	W					F	NA		OB
3x	P	PN				G	W					F			OB
3x	P	PN			C	G	W					F			OB
2x	P	PN	KF	TE	C	G	W	PY	S	K			F		OB
2x	P	PN	KF	TE	C	G	W	PY	S	K	CS		F		OB
2x	P	PN	KF			G	W	PY					F		OB
<u>2x</u>	P	PN	KF	TE	C	G	W	PY	S	K					OB

51x mehrfach auftretende Resistenzmuster;
35 weitere waren untereinander verschieden.

Enterobacter

5x	P	PN	KF			G	W								OB
3x	P	PN	KF	TE	C	G	W		S				F		OB
<u>2x</u>	P		KF			G	W								OB

10x mehrfach auftretende Resistenzmuster;
15 weitere waren untereinander verschieden.

S. aureus

OB E MY FD NV

4x						W
3x					G	W
<u>3x</u>	P	PN				W

10x mehrfach auftretende Resistenzmuster;
20 weitere waren untereinander verschieden.

Tabelle 6a

Verteilung der Häufigkeit der Einzelresistenzen unter Enterobacteriaceae und S. aureus.

	P	PN	KF	TE	C	G	W	PY	S	K	CS	CN	F	NA	OB
<u>E. coli</u>	Anzahl	25	17	18	11	9	21	25	9	11	7	6	2	8	2
	%	100	68	72	44	36	84	100	36	44	28	24	8	32	25
	RF	2	6	5	7	9	4	1	10	8	12	13	14	11	100
<u>Proteus</u>	Anzahl	148	47	109	118	45	162	170	31	26	29	163	2	104	170
	%	82	27	64	70	26	95	100	18	15	17	96	1	61	100
	RF	5	9	7	6	10	4	1	11	13	12	3	15	8	100
<u>Klebsiella</u>	Anzahl	72	70	52	23	33	67	72	38	25	21	5	1	34	72
	%	100	97	72	32	46	93	100	53	34	29	7	1	47	100
	RF	2	4	6	11	9	5	1	7	10	13	14	15	8	3
<u>Enterobacter</u>	Anzahl	18	13	17	6	6	19	20	-	7	4	5	-	6	20
	%	90	65	85	30	30	95	100	-	35	20	25	-	30	100
	RF	4	6	5	8	8	3	1	-	7	10	9	-	8	2
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	Anzahl	90	90	90	58	85	90	90	9	45	79	1	4	86	90
	%	100	100	100	65	94	100	100	10	50	88	1	4	96	100
	RF	2	6	5	11	8	4	1	13	12	9	15	14	7	3
<u>S. aureus</u>	Anzahl	14	10	5	11	9	20	27	E	MY	FD	NV			
	%	52	37	19	41	33	74	100	7	3	3	9			3
	RF	3	5	8	4	6	2	1	26	1	1	9			1
									7	9	9	6			9

RF = Rangfolge der einzelnen Antibiotika im Auftreten ihrer Resistenzeigenschaft im Rahmen des üblichen klinischen Antibiogramms. Ciciacillin wurde zu diesem Zeitpunkt routinemäßig noch nicht mitgetestet.

Tabelle 6 b

Arithmetisches Mittel der Rangfolgen der TMP-resistenten Enterobacterien.

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.
W	OB	P	G	KF	PN	C	F	TE	S	PY	CS	NA	K	CN
RF 1	2	3	3,6	5	5,4	7	8,5	8,6	9,6	10	11,4	11,6	11,8	13,2

Arithmetisches Mittel der Rangfolge der TMP-resistenten S. aureus.

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.
W	G	P	TE	PN	C	E	KF	OB	MY	FD

Tabelle 7

Die Wirkung der TMP/SMZ-Kombination im Agardiffusionstest.

Nach 12 Std. bei 37°C in Mueller-Hinton-Agar

	Lfd.Nr.	ROL Ø in mm	W Ø in mm	SXT Ø in mm	Ø Dif- ferenz in mm
<u>E. coli</u>	9321	kleiner 5	27	27	0
	9334	17	23	26	+ 3
	9338	21	23	27	+ 4
	9342	kleiner 5	24	25	+ 1
	9348	13	24	28	+ 4
	9361	kleiner 5	26	26	0
	8329	20	22	29	+ 7
	8381	20	23	26	+ 3
	8612	18	22	27	+ 5
	8923	17	25	27	+ 2
	9350	kleiner 5	20	22	+ 2
	9367	18	27	30	+ 3
	9370	17	24	24	0
	9379	17	22	27	+ 5
	9391	21	22	27	+ 5
	9403	kleiner 5	20	22	+ 2
	9421	16	25	27	+ 2
	9604	18	22	25	+ 3
	9624	kleiner 5	25	25	0
	9601	17	22	27	+ 5
	9622	16	22	26	+ 4
	9763	17	24	28	+ 4
	9861	18	27	33	+ 6
<u>Proteus</u>	427-4	kleiner 5	10	22	+12
	436-6	13	21	28	+ 7
<u>Proteus</u>	416-8	kleiner 5	19	20	+ 1
	416-3	kleiner 5	9	13	+ 4
	7034	kleiner 5	-	-	0

	Lfd.Nr.	ROL Ø in mm	W Ø in mm	SXT Ø in mm	Ø Dif- ferenz in mm
<u>Klebsiella</u>	1532	kleiner 5	10	14	+ 4
<u>S. aureus</u>	60746	-	-	9	+ 9
	4086	-	-	14	+14
Nach 12 Std. bei 37°C in DST-Oxoid Agar					
<u>E. coli</u>	1650	kleiner 5	23	24	+ 1
	31333	28	35	41	+ 6
<u>Proteus</u>	7037	-	-	30	+30
	8358	18	20	34	+14
<u>Klebsiella</u>	8737	17	19	24	+ 5
	7064	20	38	39	+ 1
	5178	-	-	10	+10
<u>Enterobacter</u>	4428	28	30	35	+ 5
<u>S. aureus</u>	6279	25	27	38	+11
	0732	15	19	35	+16
<u>P. aeruginosa</u>	8886	-	-	18	+18

Tabelle 8

HK₅₀ (μ g TMP/ml) der Kulturextrakte nach ca. 24 Std. bei 30°C belüftet gewachsener Kulturen.

Stamm Nr.	TSB (μ g TMP/ml)	TSB Wiederh.	MHB (μ g TMP/ml)	Ammonium- glucose	Diffusions- testergebnis sens./resist.	MHK (μ g/ml)
<u>E. coli:</u>						
FDA	grob 0,37 fein 0,28	grob 0,35 0,37	grob 0,41	grob 0,047	+	0,8
38954	grob 12,0 fein 16,5	13,5 14,0	2,3	2,8	-	100
39188	grob 0,38				+	1
68489	4,81	3,5			-	100
68495	2,5				-	10
<u>Klebsiella:</u>						
321-6	0,33				+	1
1532	7,8	7,5			-	100
65633	1,25				-	10
65311	19,25				-	100
<u>Enterobacter:</u>						
222-3	0,58				+	1
4794	4,3				-	100
67844	4,0				-	100

Stamm Nr.	TSB (μ g TMP/ml)	TSB Wiederh.	MHB (μ g TMP/ml)	Ammonium- glucose	Diffusions- testergebnis sens./resist.	MHK (μ g/ml)
<u>Proteus:</u>						
236-2	1,06	1,4			+	10
416-3	19,0	8,7			-	100
7034	200				-	1000
<u>P. aeruginosa:</u>						
68886	100				-	1000
<u>S. aureus:</u>						
SG 511	0,49	0,49			+	1
4086	49,0				-	100
7835	9,1				-	100
60746	20,0				-	1000

Für die MHK sind nur Größenordnungswerte angegeben.

Tabelle 9

Einfluß der Bebrütungstemperatur auf den Ertrag der
Kontrollkulturen und die HK₅₀ des E. coli-Stammes 38954.

Nr. der Quer- reihe	Tempe- ratur °C	Ertrag der Kontrolle (mg/ml)	Zeit des Kultur- ertrags d. Kon- trolle (Std.)	HK ₅₀ (/ug/ml)	ln HK ₅₀
1	20,2	0,49	28,31	0,63	- 0,44
2	21,7	0,49	28,30	0,31	- 1,17
3	23,1	0,53	28,28	0,22	- 1,51
4	24,5	0,49	16,13	0,26	- 1,35
5	26,0	0,49	13,38	0,20	- 1,61
6	27,3	0,49	13,40	0,21	- 1,56
7	28,8	0,49	13,42	0,20	- 1,61
8	30,2	0,49	13,46	0,17	- 1,78
9	31,7	0,49	10,25	0,20	- 1,61
10	33,1	0,50	10,27	0,17	- 1,78
11	34,6	0,49	10,28	0,21	- 1,56
12	36,0	0,47	6,46	0,22	- 1,51
13	37,5	0,47	6,42	0,24	- 1,43
14	38,9	0,47	6,40	0,23	- 1,47
15	40,4	0,43	6,38	0,26	- 1,35
16	41,8	0,34	6,35	0,36	- 1,02
17	43,2	0,30	6,33	0,40	- 0,92
18	44,6	0,23	8,04	0,42	- 0,87

Elimination von TMP- und anderen Resistenzdeterminanten mittels Ethidium-Bromid.

Stamm	Zeit (Std.)	subinhibitori- sche EB-Konzen- tration ($\mu\text{g/ml}$)	HK ₅₀ in EB ($\mu\text{g/ml}$)	Anzahl der ge- testeten Kolonien	Anzahl der TMP sensib- len	%	Leder- berg TMP- sensib- le (%)	Anzahl neuer anderer Sensi- bili- täten	%
<u>E. coli</u>									
38954	12	40	24	25	4	16		S = 2	8
	24	40	48	25	10	43,5	16	CI=19	76
1. Subkultur	24	40		25	2	8	19,5	CI=12	36
2. Subkultur	36	40		25	2	8		CI=5	20
Eltern	12	60	24	50	21	42	43,7	S = 1	2
	24	60	48	25	3	12		CI=4	16
1. Subkultur	24	60		25	7	28	55,1	CI=2	8
2. Subkultur	36	60		25	2	8	16,7		
Eltern	12	80	24	25	11	44	45	CI=4	16
	24	80	48	25	2	8	27,7	CI=2	8
1. Subkultur	24	80		25	7	28		CI=2	8
2. Subkultur	36	80		25	0	0	23,8	CI=2	8
68489	12	100	86	50	14	28		CI=2	4
68495	12	80	4	50	50	100		PN=38	76
								CI=2	4
								PN=18	36

Stamm	Zeit (Std.)	subinhibitori- sche EB-Konzen- tration ($\mu\text{g/ml}$)	HK50 in EB ($\mu\text{g/ml}$)	Anzahl der ge- testeten Kolonien	Anzahl der TMP sensib- len	%	Leder- berg TMP- sensib- le (%)	Anzahl neuer anderer Sensib- lilitä- ten	%
<u>Klebsiella</u>									
1532	12	100	60	50	1	2	0	TE= 4	8
<u>Proteus</u>									
37034	12	500	195	25	0	0		PN= 6	24
416-3	12	100	195	25	0	0		PN=23	92
	12	500	150	50	0	0			
	12	1000	150	50	6	12		C = 1	2
<u>S. aureus</u>									
4086	12	1	2,6	25	0	0		C = 4 P = 7	16 28
60746	12	1	0,42	50	2	4		C =20 G = 4	40 8

Tabelle 11

Spontanverlust des E. coli-Stammes 38954.

Trimethoprimresistenzspontanverlust

Zeit	45°C	30°C
6 Std.	20 %	12 %
12 Std.	0 %	6 %
24 Std.	10 %	0 %

Ciclacillin-Spontanresistenzverlust

Zeit	45°C	30°C
6 Std.	36 %, gleich- zeitig 16 % TMP- Resistenz- Verlust	46 %, gleichzeitig 8 % TMP- Resistenz- Verlust
12 Std.	100 %	100 %
24 Std.	100 %	100 %

Abbildung 1

Schematische Darstellung der Biosynthese von Tetrahydrofolsäure.

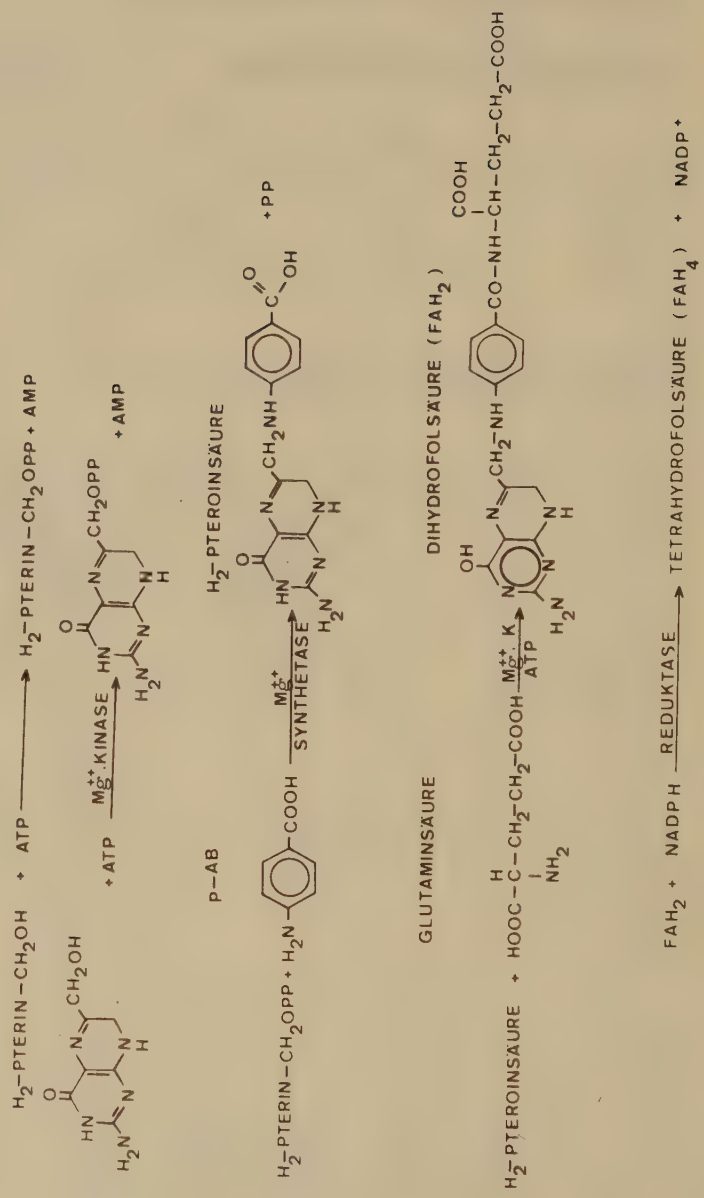


Diagram illustrating the biosynthesis of Folate (Folic Acid) from H₂-Pterin:

Reaction 1: H₂-PTERIN + ATP → H₂-PTEROINSÄURE (+ GLUTAMINSÄURE) + AMP (Enzyme: ENZYM, requires Mg²⁺)

Reaction 2: H₂-PTEROINSÄURE (+ GLUTAMINSÄURE) + SMZ → FOLATANALOGON

Reaction 3: (TETRAHYDROFOLSÄURE) FAH₄ → DIHYDROFOLAT-FAH₂ (DIHYDROFOLSÄURE) (Enzyme: DIHYDROFOLAT-REDUKTASE)

Reaction 4: DIHYDROFOLAT-FAH₂ → THYMIDILAT-FAH₄ (Enzyme: SYNTHETASE)

Reaction 5: THYMIDILAT-FAH₄ → N⁵,N¹⁰METHYLEN-FAH₄ → N⁵METHYL-FAH₄ → METHIONIN

Reaction 6: (TETRAHYDROFOLSÄURE) FAH₄ + FORMIAT → N⁵FORMYL-FAH₄ → N¹⁰FORMYL-FAH₄ → PURINE

Reaction 7: N⁵FORMYL-FAH₄ ↔ N¹⁰FORMYL-FAH₄

Reaction 8: N⁵,N¹⁰METHYLEN-FAH₄ → PURINE

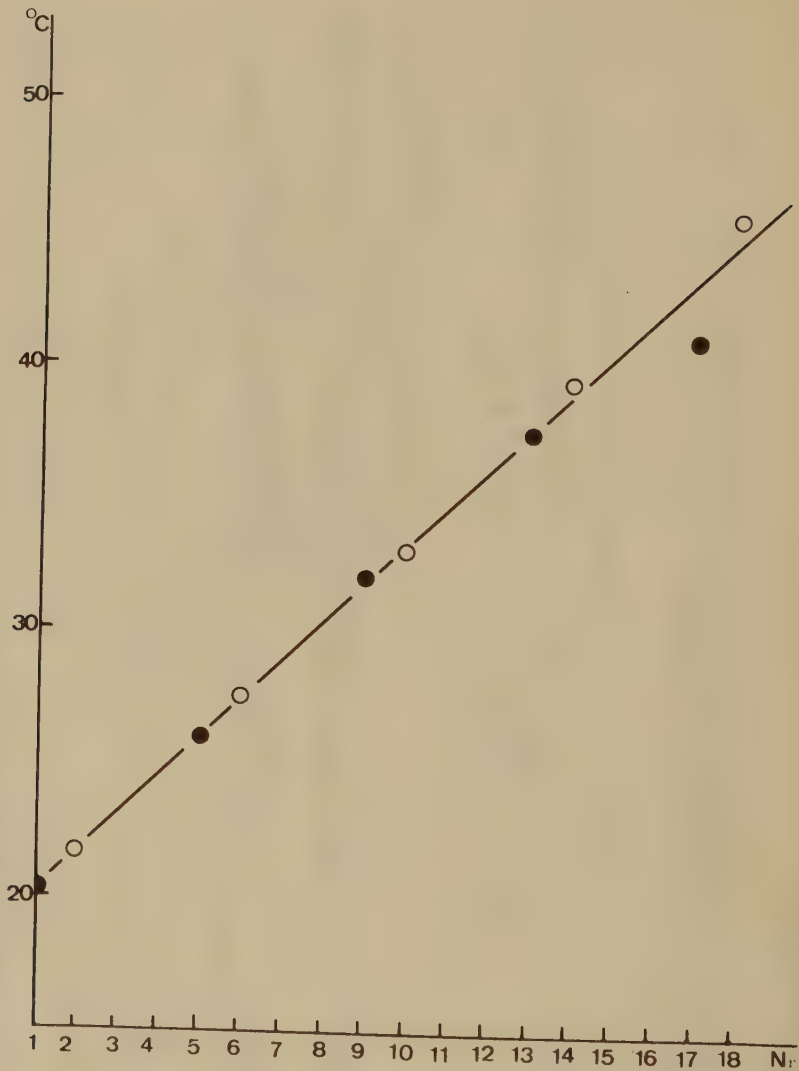
Chemical Structure of H₂-Pterin: A pteridine ring system with an amino group at position 2 and a 4-aminobenzoyl group at position 6.

Chemical Structure of Folate (Folic Acid): A pteridine ring system with an amino group at position 2 and a 4-aminobenzoyl group at position 6, with a methylene group at position 4.

Trimethoprim hemmt die Dihydrofolatreduktase (vgl. auch SEYDEL 1973 und MIOVIC und PIZER 1971)

Abbildung 3

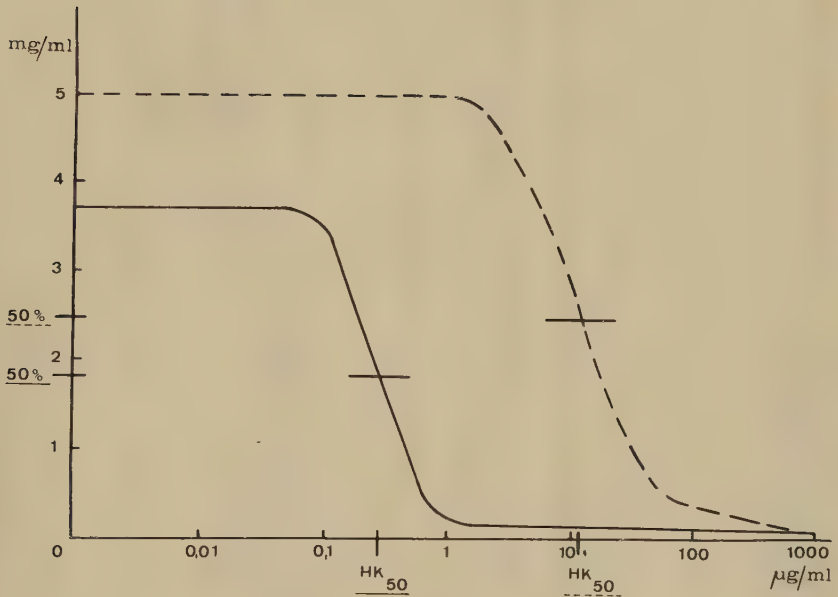
Temperaturgradient des Inkubators.



(vgl. auch Tab. 9)

Abbildung 4

Hemmwirkungskurve von TMP der E. coli-Stämme FDA und 38954
in TSB nach 24 Std. bei 30°C Bebrütungstemperatur.

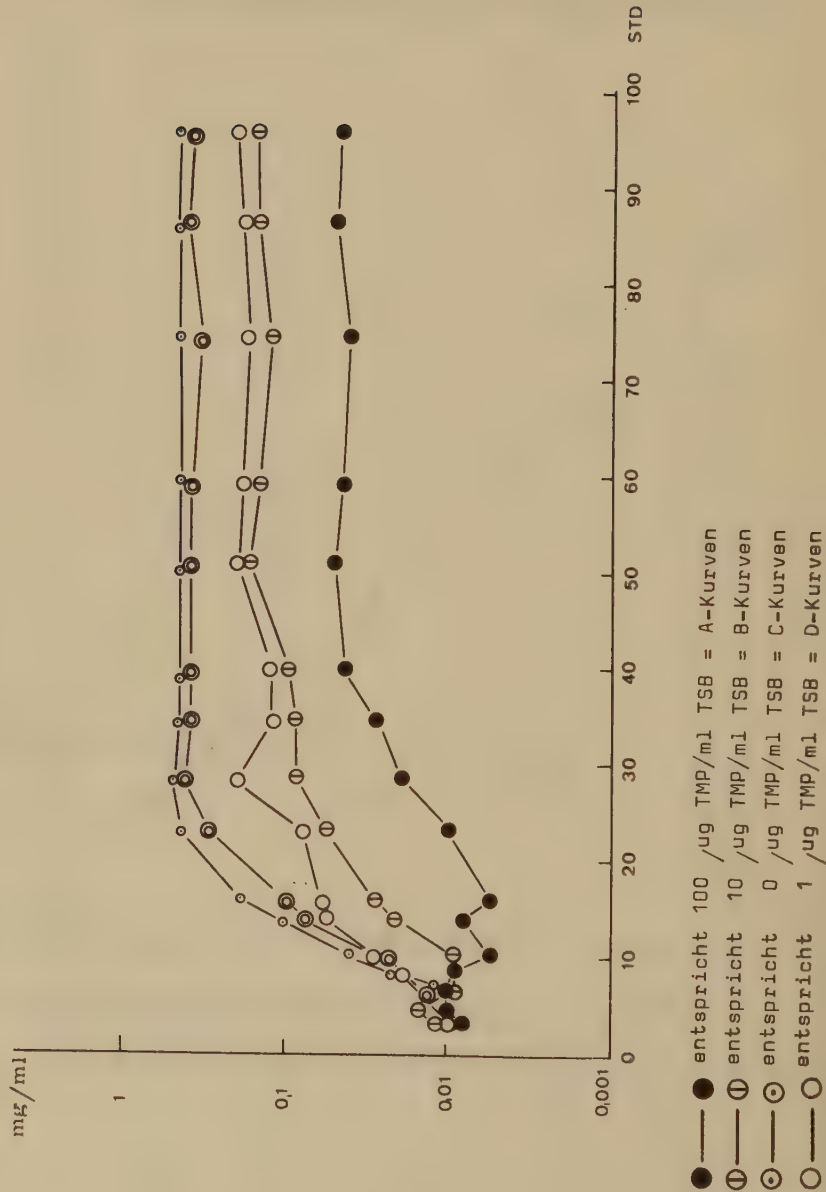


---- entspricht der Hemmwirkungskurve des E. coli-Stammes 38954

— entspricht der Hemmwirkungskurve des E. coli-Stammes FDA

Abbildung 5

Kulturverhalten des *E. coli*-Stammes 38954 in TSB in Abhängigkeit verschiedener TMP-Konzentrationen bei 20,2°C Bebrütungstemperatur.



Kulturverhalten des *E. coli*-Stammes 38954 in Abhängigkeit verschiedener TMP-Konzentrationen bei 44,6°C Bebrütungstemperatur.

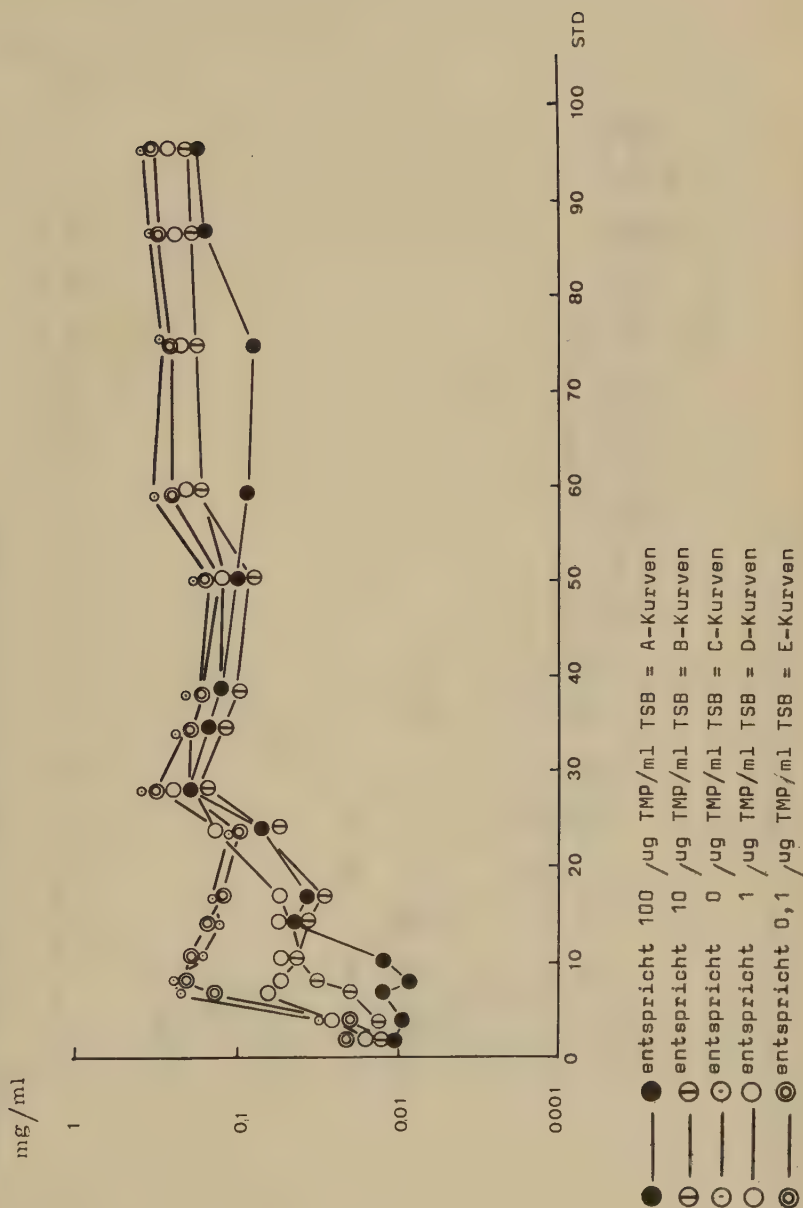
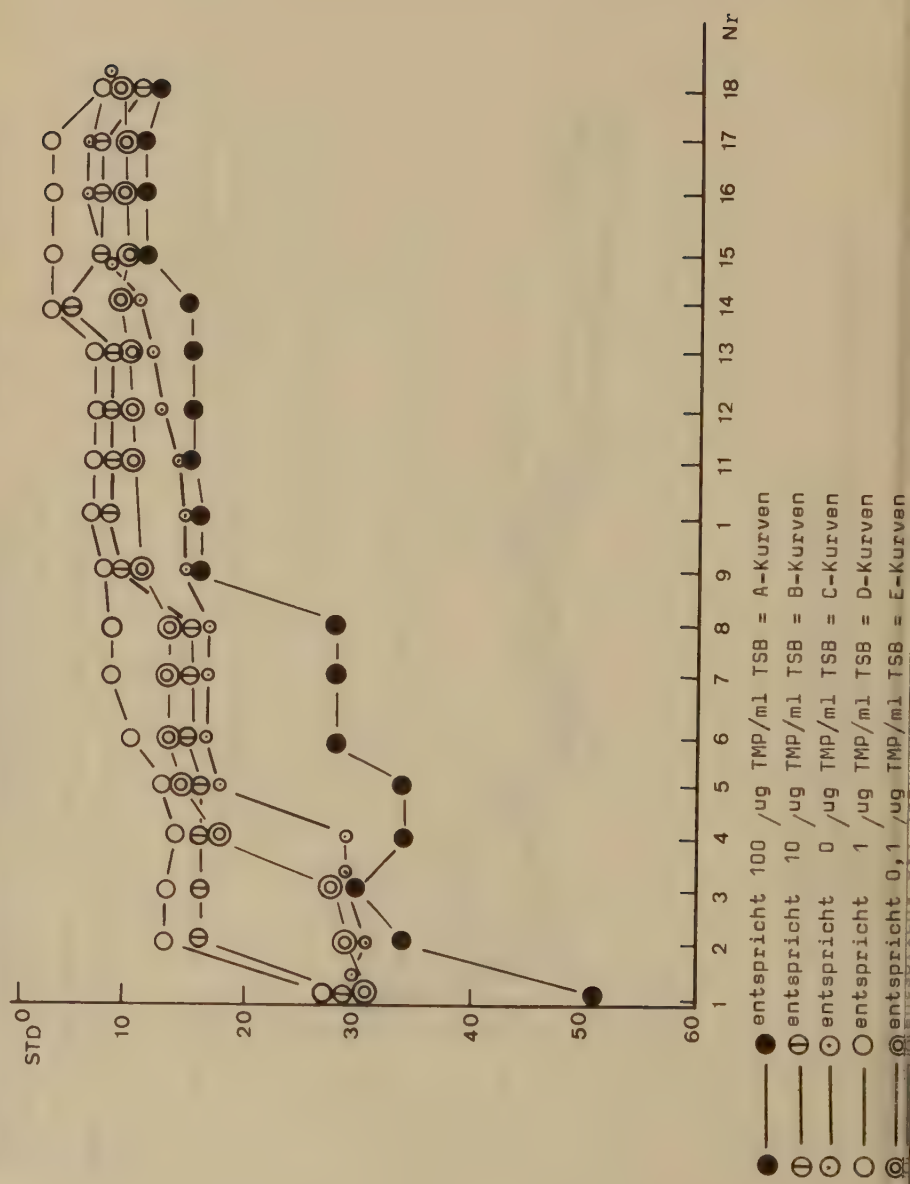


Abbildung 7

Zeitpunkt des Erreichens des Kulturertrages in Abhängigkeit unterschiedlicher
Bebrütungstemperaturen. Stamm: E. coli 38954.



Wachstumsraten in Abhängigkeit zur Bebrütungstemperatur.

Stamm: *E. coli* 38954; Medium: TSB.

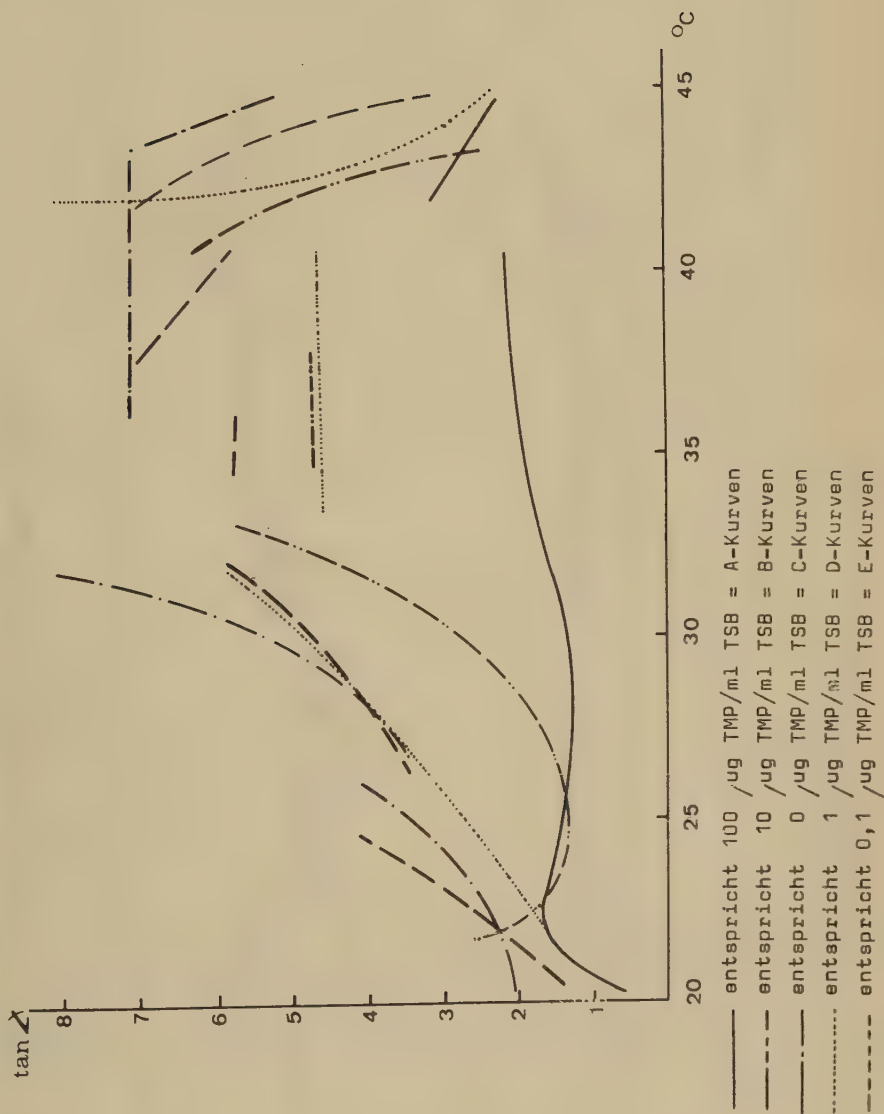


Abbildung 7

Kulturerträge in Abhängigkeit zur Bebrütungstemperatur.

Stamm: *E. coli* 38954; Medium: TSB.

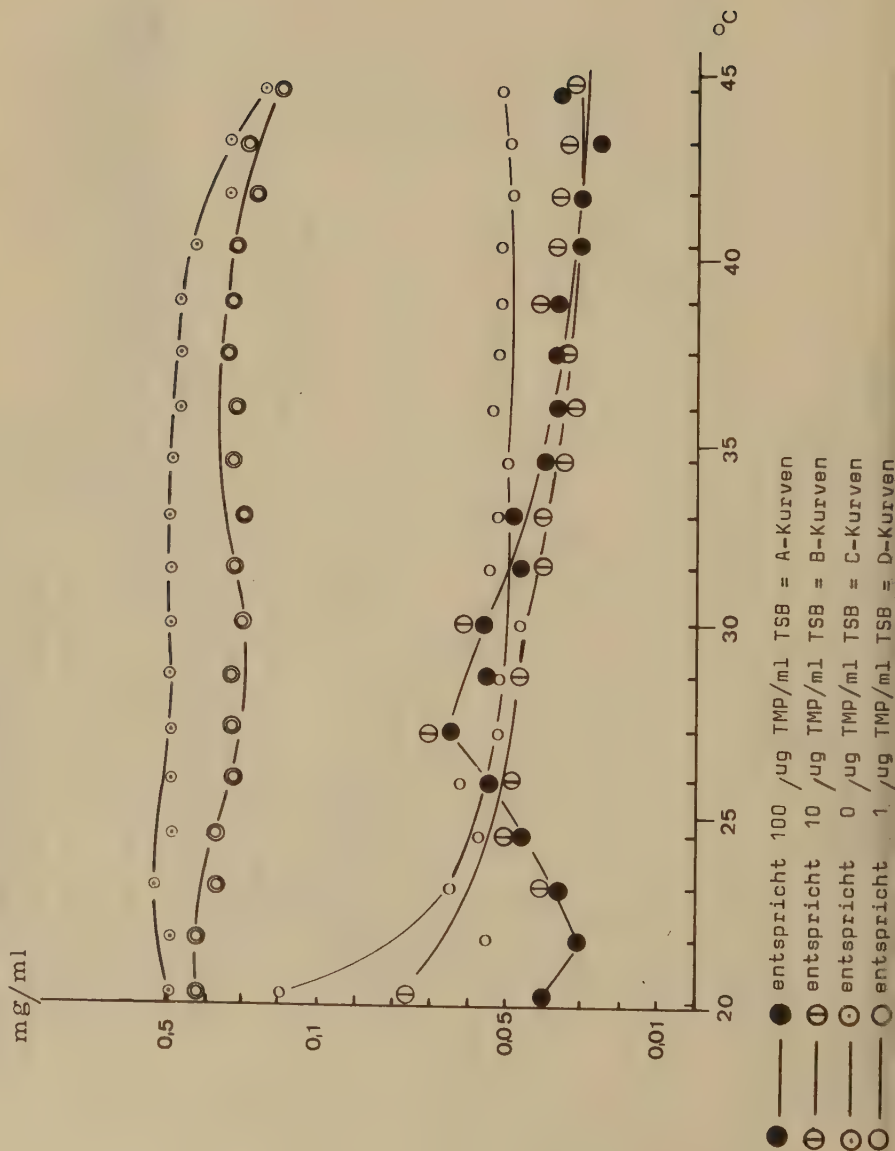


Abbildung 10

ln HK₅₀ von TMP unter Einfluß der Bebrütungstemperatur.
Stamm: E. coli 38954; Medium: TSB.

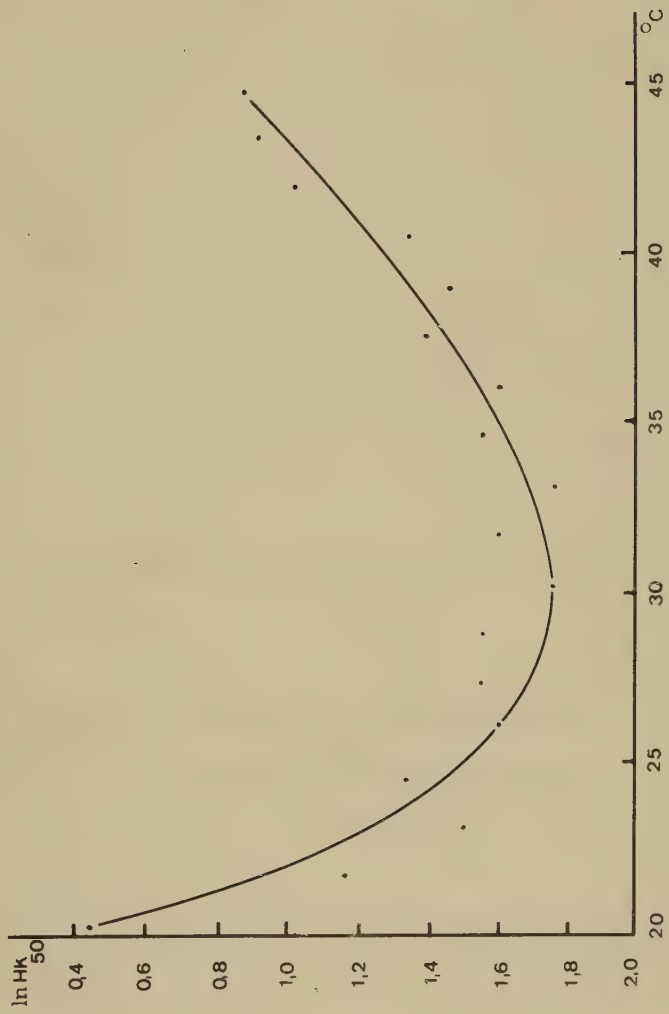


Abbildung 11

Hemmwirkungskurve von EB des E. coli-Stammes 38954 in TSB nach 12 Std. bei 30°C Bebrütungstemperatur.

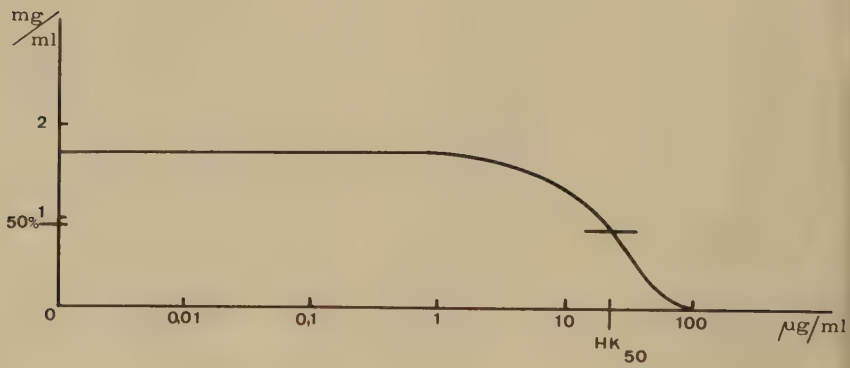
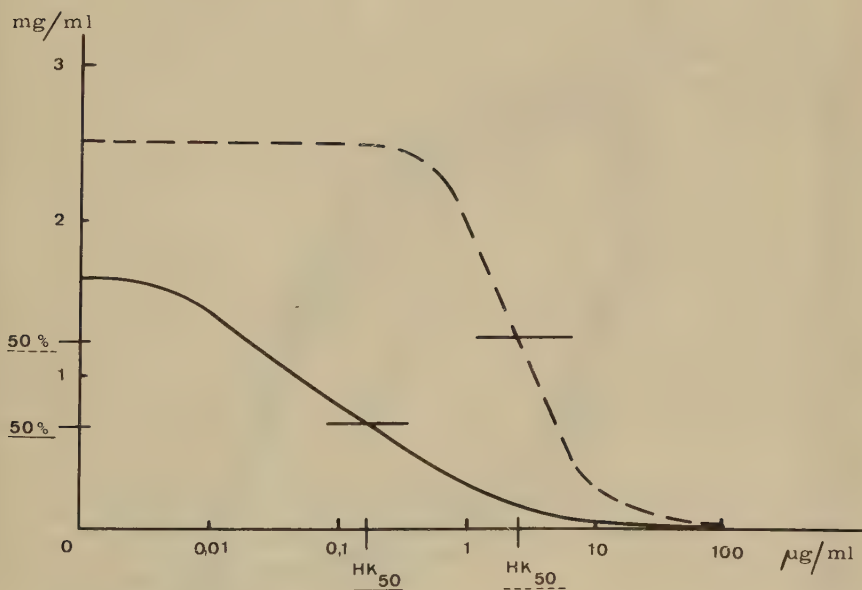


Abbildung 12

Hemmwirkungskurve des E. coli 68489 in TSB nach 24 Std.
bei 30°C Bebrütungstemperatur, vor und nach 24-std. Behand-
lung mit EB.

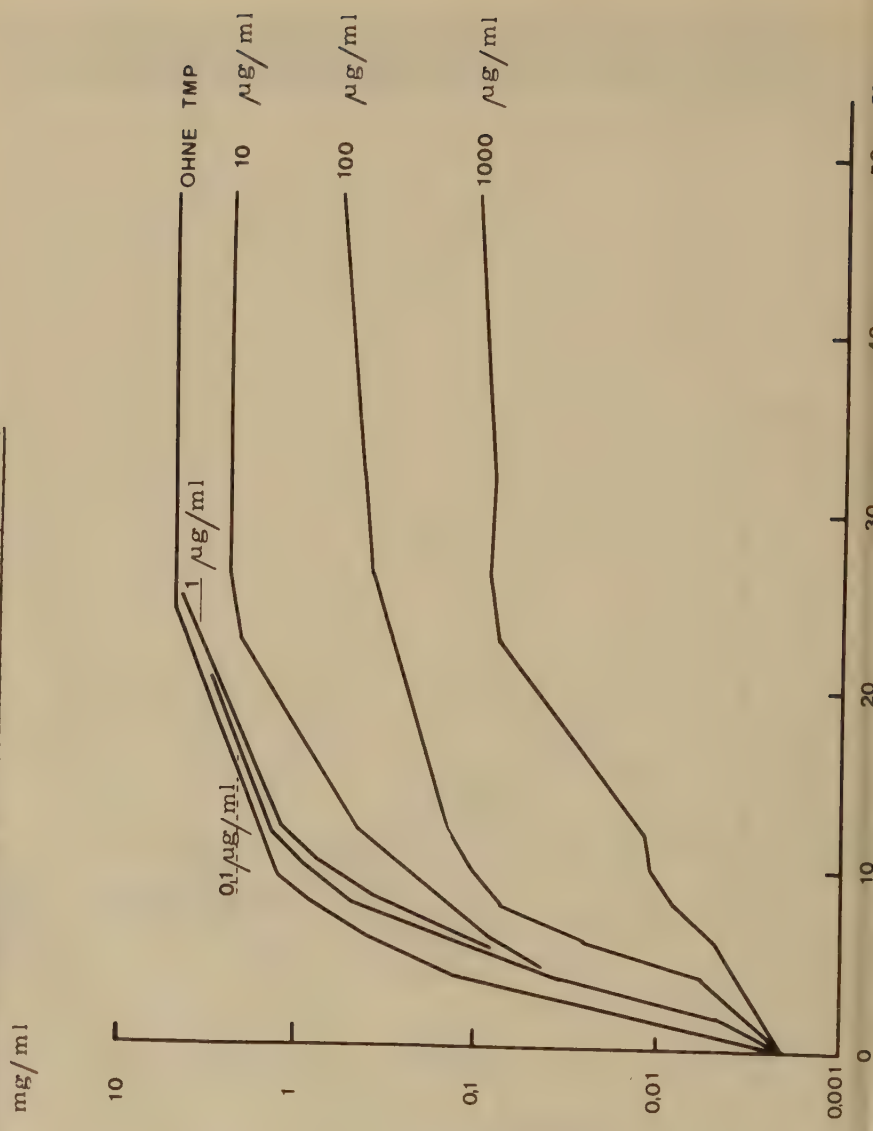


---- vor der Behandlung mit EB

— nach der Behandlung mit EB

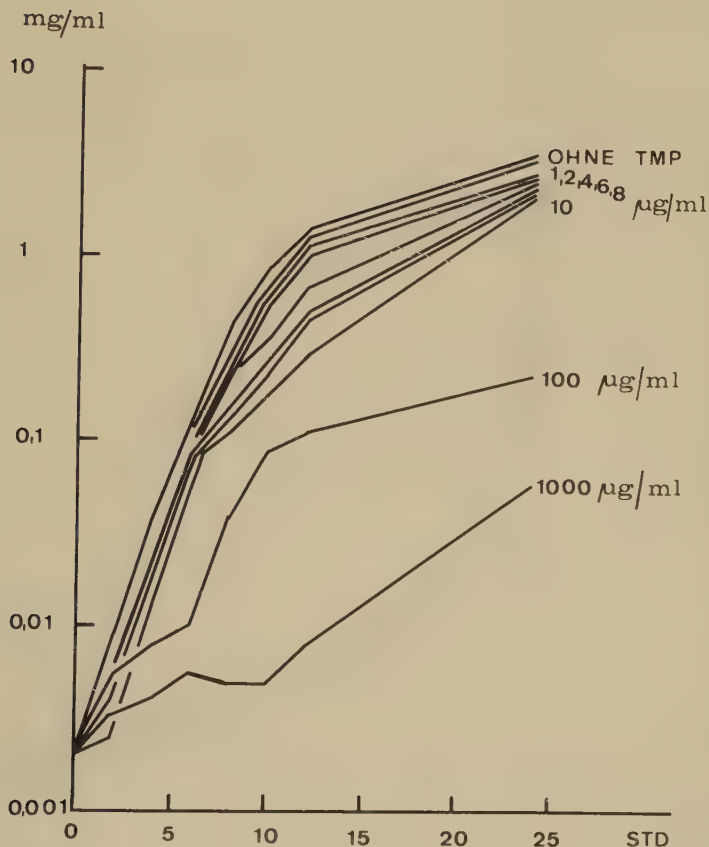
Wachstumskurve 1

Kulturverhalten des E. coli-Stammes 38954 in Abhängigkeit verschiedener
TMP-Konzentrationen in TSB bei 30°C Bebrütungstemperatur.



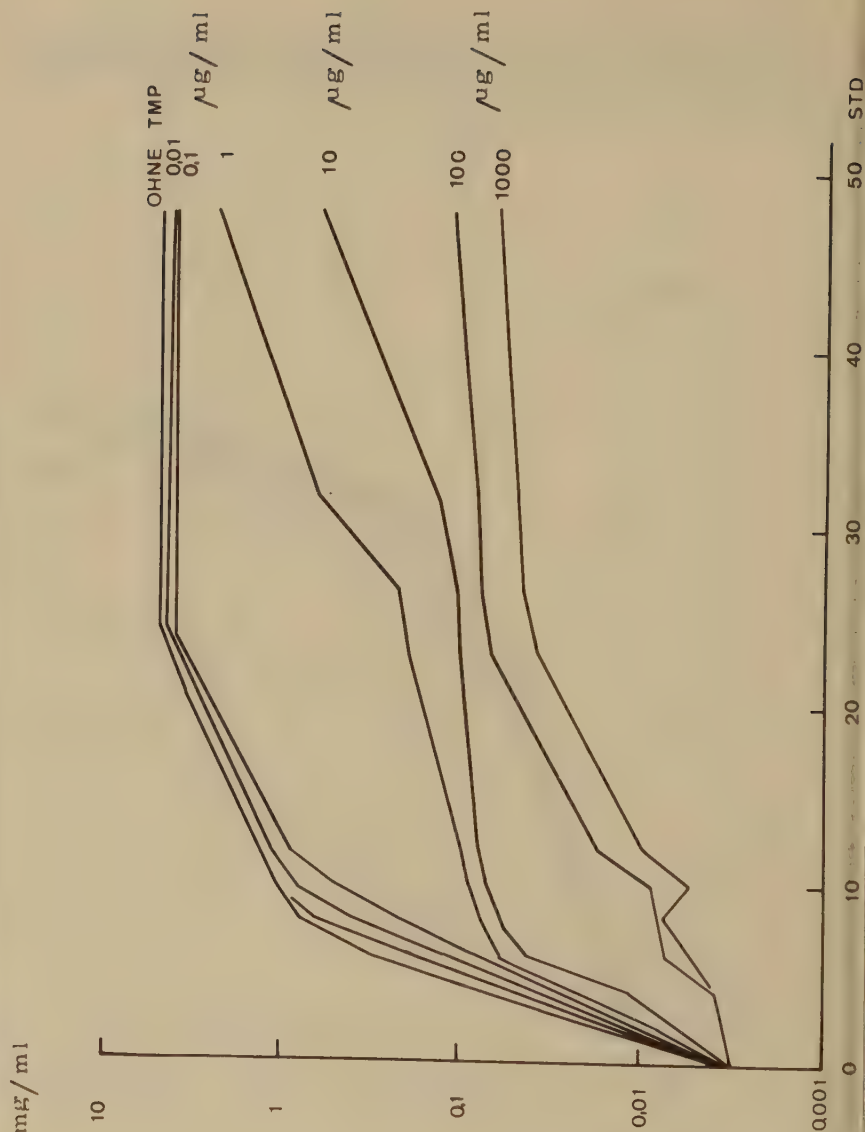
Wachstumskurve 2

Kulturverhalten des E. coli-Stammes 38954 in Abhängigkeit verschiedener, differenziert abgestufter TMP-Konzentrationen in TSB bei 30°C Bebrütungstemperatur.



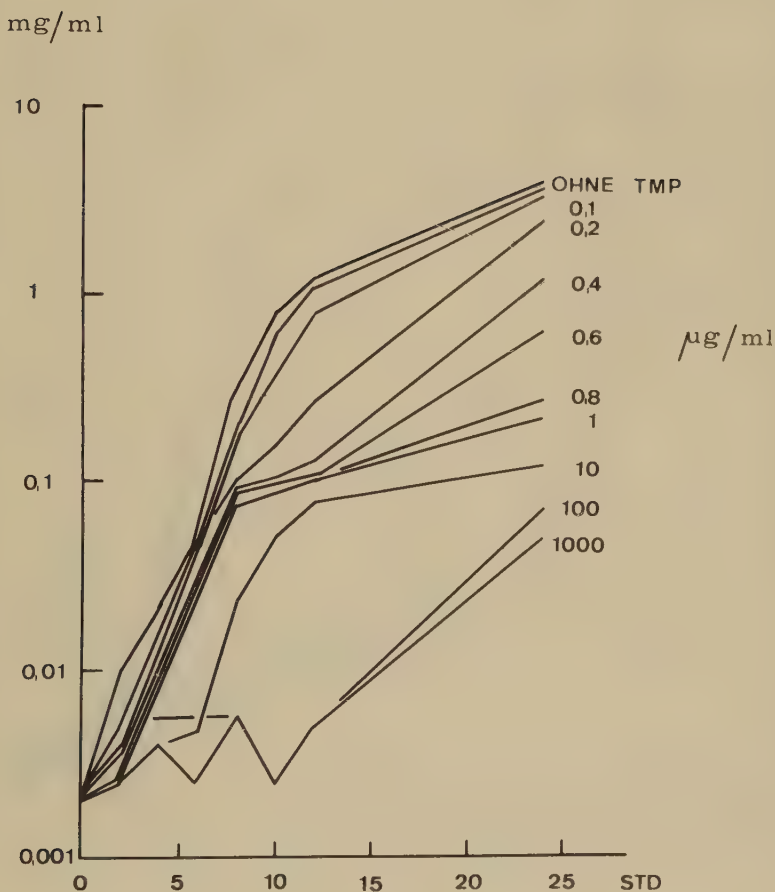
Wachstumskurve 3

Kulturverhalten des *E. coli*-Stammes FDA in Abhängigkeit verschiedener TMP-Konzentrationen in TSB bei 30°C Bebrütungstemperatur.



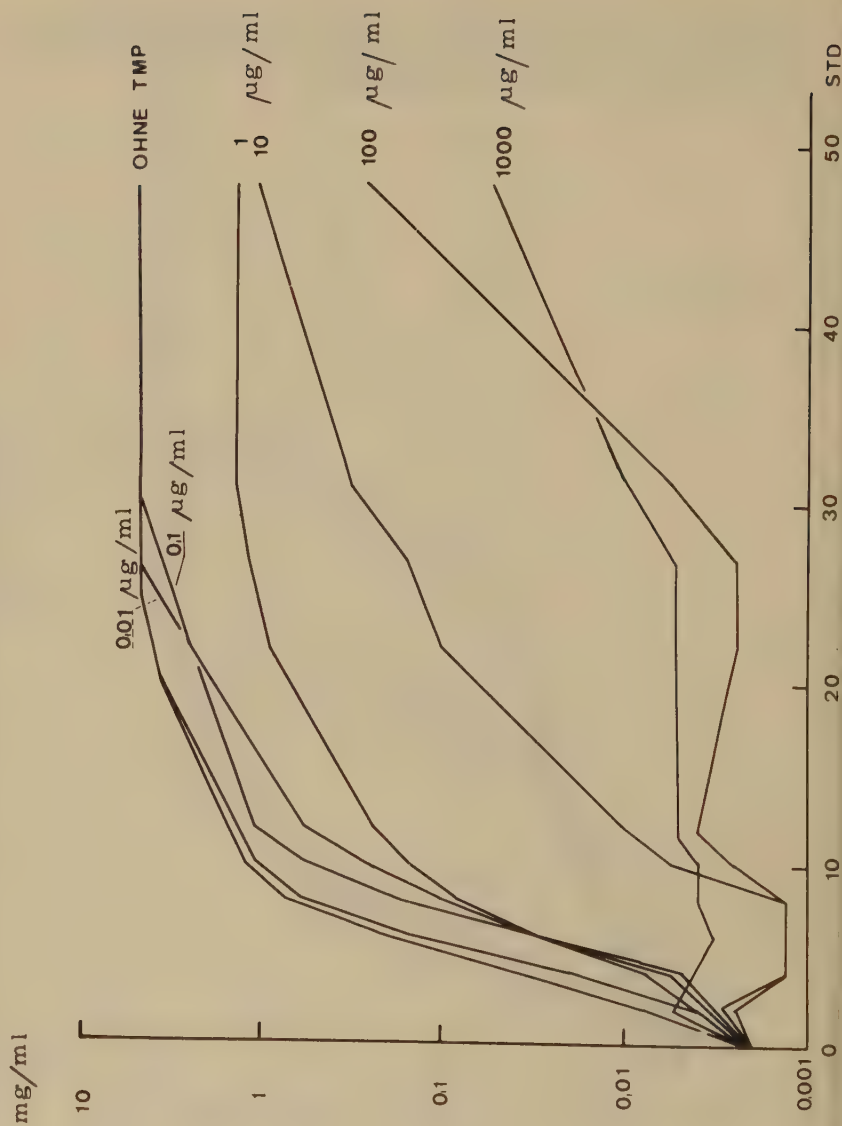
Wachstumskurve 4

Kulturverhalten des E. coli-Stammes FDA in Abhängigkeit verschiedener, differenziert abgestufter TMP-Konzentrationen in TSB bei 30°C Bebrütungstemperatur.



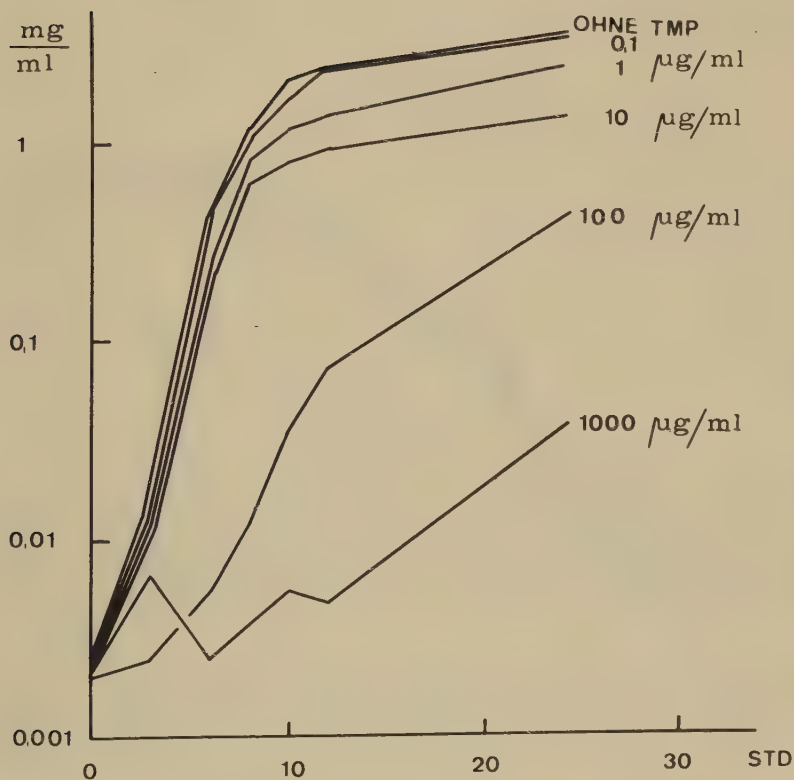
Wachstumskurve 5

Kulturverhalten des E. coli-Stammes 39188 in Abhängigkeit verschiedener TMP-Konzentrationen in TSB bei 30°C Bebrütungstemperatur.



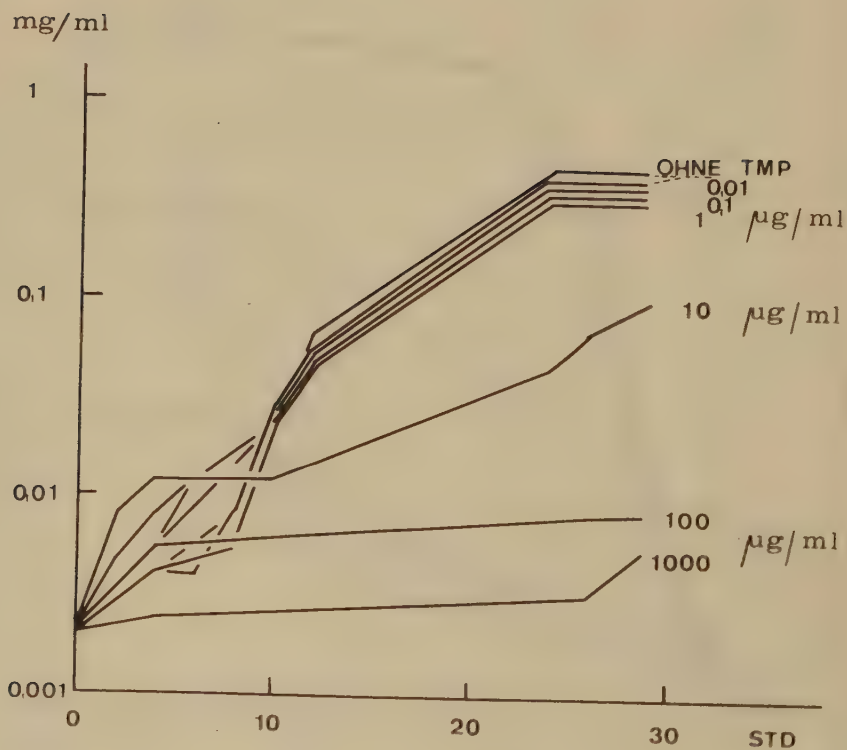
Wachstumskurve 6

Kulturverhalten des E. coli-Stammes 38954 in Abhängig-
keit verschiedener TMP-Konzentrationen in MHB bei
30°C Bebrütungstemperatur.



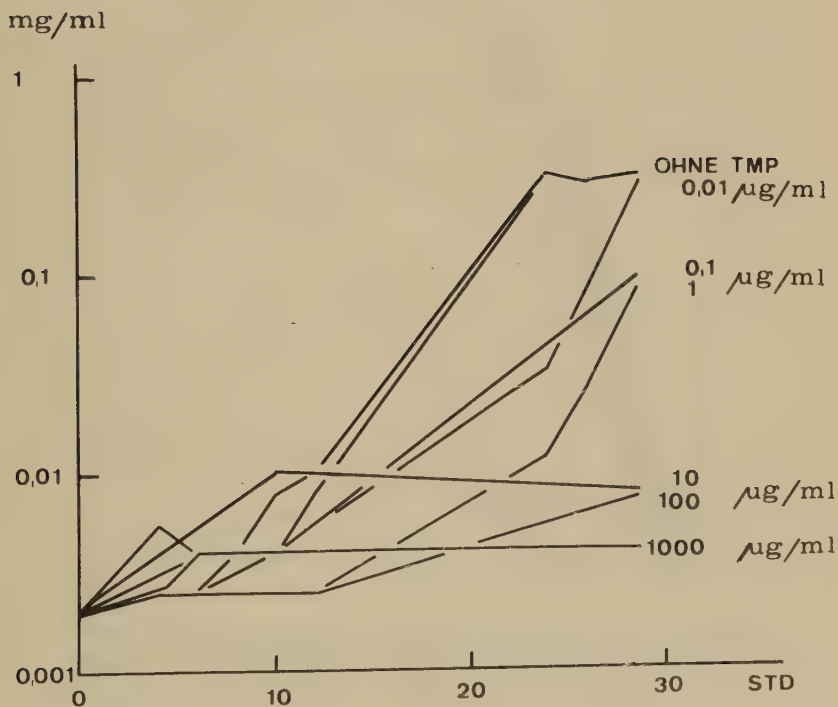
Wachstumskurve 7

Kulturverhalten des E. coli-Stammes 38954 in Abhängigkeit
verschiedener TMP-Konzentrationen in Ammonium-Glucose-
Medium bei 30°C Bebrütungstemperatur.



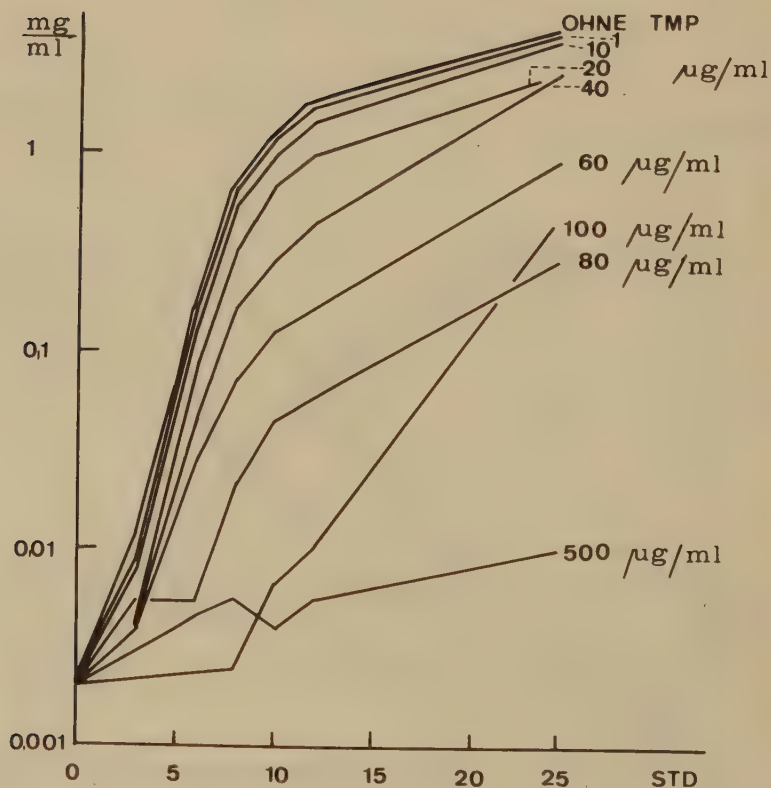
Wachstumskurve 8

Kulturverhalten des E. coli-Stammes FDA in Abhängigkeit
verschiedener TMP-Konzentrationen in Ammonium-Glucose-
Medium bei 30°C Bebrütungstemperatur.



Wachstumskurve 9

Kulturverhalten des E. coli-Stammes 38954 in Abhängigkeit verschiedener EB-Konzentrationen in TSB bei 30°C Bebrütungs-temperatur.



L I T E R A T U R

1. ABRAHAM, E. P., CHAIN, E., FLETCHER, C. M., FLOREY, H.W.,
GARDENER, A. D., HEATLEY, N, G., and JENNINGS, M. A.:

Lancet, 2, 177 (1941)

2. AKIBA, T., KOYAMA, K., KIMURA, S., and FUKUSHIMA, T.:
Studies on mechanism of transfer of drug-resistance
in bacteria. VIII. Experiments on the transfer of
drugresistance in vivo.
Med. Biol., 59, 185 (1961)

3. AKIBA, T.:
Mechanism of development of resistance in Shigella.
Medicine of Japan in 1959.
Proc. 15th Gen. Meeting of the Japan Med. Assoc. 5,
299 (1959) ref. von WATANABE, T.: Bact. Rev., 27,
87 (1963)

4. ANDERSON, E. S., and DATTA, N.:
Resistance to penicillins and its transfer in
Enterobacteriaceae.
Lancet, Febr. 20, 407 (1965)

5. ANDERSON, E. S.:
The ecology of transferable drug resistance in the
enterobacteria.
Ann. Rev. Microbiol., 22, 131 - 180 (1968)

6. ANTON, A. H.:
The relation between the binding of sulfonamides
to albumin and their antibacterial efficiacy.
J. Pharmac. exp. Ther., 129, 282 - 290 (1960)

7. ARBER, W.:
Transduktion of chromosomal genes and episomes
in E. coli.
Virology, 11, 273 - 288 (1960)

8. AUWÄRTER, W.:
Hahnenklee-Symposium 25.-26. Mai 1973.
Editiones Roche
9. BACH, M. C., FINLAND, M., GOLD, O., and WILCOX, C.:
Susceptibility of recently isolated pathogenetic
bacteria to Trimethoprim and Sulfamethoxazole
separately and combined.
J. Infect. Dis., 128, 508 - 533 (1973)
10. BARKER, J., HEALING, D., HUTCHINSON, J. G. P.:
Characteristics of some co-trimethoxazole-resistant
Enterobacteriaceae from infected patients.
J. Clin. Path., 25, 1086 - 1088 (1972)
11. BERTINO, J. B., and STACEY, K. A.:
A suggested mechanism for the selective procedure for
isolating thymine-requiring mutants of *Escherischia*
coli.
Biochem. J., 101, 32 C. (1966)
12. BOCK, L., MILLER, G. H., SCHAPER, K. J., SEYDEL, J. K.:

J. Med. Chem., (1973)
13. BÖHNI, E.:
Vergleichende bakteriologische Untersuchungen mit der
Kombination Trimethoprim/Sulfamethoxazol in vitro
und in vivo.
Chemotherapy, 14, 1 - 21, (1969a)
14. BÖHNI, E.:
Antibacterial activity of the combination trimethoprim-
sulfamethoxazol compared with antibiotics.
Schweiz. Med. Wschr., 99, 1505 - 1510 (18. Oct. 1969b)

15. BÖHNI, E.:
Chemotherapeutic activity of the combination of trimethoprim and sulfamethoxazole in infections of mice.
Postgrad. Med. J., 45, 18 (1969c)
16. BOUANCHAUD, D. H., SCAVIZZI, M. R., and CHABBERT, Y.A.:
Elimination by Ethidium Bromide of Antibiotic Resistance in Enterobacterobacteria and Staphylococci.
J. gen. Microbiol., 54, 417-- 425 (1969)
17. BUCKLE, G.:
Resistance of Staphylococcus aureus to sulfamethoxazole and trimethoprim.
J. Clin. Path., 26, 242 (1973)
18. BUSHBY, S. R. M., and BARNETT, M.:
Trimethoprim - Sulfonamides. In vitro sensitivity of 384 strains of bacteria.
Proceedings 5th International Congress of Chemotherapy, Vienna, June 25 - July 2, (1967), A 1-6/11, 753 - 757
19. BUSHBY, S. R. M., and HITCHINGS, G. H.:
Trimethoprim, a sulfonamide potentiator.
Brit. J. Pharmacol., 33, 72 (1968)
20. BUSHBY, S. R. M.:
Combined antibacterial action in vitro of trimethoprim and sulphonamides. The in vitro nature of synergy.
Postgrad. Med. J., 45, 10 - 8, (Nov. 1969)
21. BUSHBY, S. R. M.:
Sensitivity Testing with Trimethoprim/Sulfamethoxazole.
Med. J. Aust. Special Suppl., 1, 10 - 18 (1973)
22. BURCHALL, J. J., and HITCHINGS, G. H.:
Inhibitor binding analysis of dihydrofolate-reductases from various species.
Molec. Pharmac., 1, 126 - 136 (1965)

23. BURCHALL, J. J.:
Comparative studies of dihydrofolatereductase.
Postgrad. Med. J., 45, 29 (1969)
24. BURCHALL, J. J.:
Mechanism of Action of Trimethoprim-Sulfamethoxazole II.
J. Infect. Dis., 128, 437 (1973)
25. CLARKE, M. L.:
A mixture of diaveridine and sulphaquinoxaline as a
coccidiostat for poultry. ;. Prelimnary studies on
efficiency against Eimeria tenella and E. necatrix
infections, and on toxicity in poultry.
Vet. Rec., 74, 845 - 848 (1962)
26. COOPER, R. G., and WALD, M.:
Succesful Treatment of Proteus Septicaemia with a
New Drug, Trimethoprim.
Med. J. Aust., 2, 93 (1964)
27. CSONKA, G. W., and KNIGHT, G. J.:
Therapeutic Trial of Trimethoprim as a Potentiator
of Sulfonamides in Gonorrhoea.
Brit. J. vener. Dis., 43, 161 (1967)
28. DAHLHOFF, A.:
Hahnenklee-Symposium 25. - 26. Mai 1973.
Editiones Roche
29. DALE, B. A., and GREENBERG, G. R.:
Effect of the Folic Acid Analogue, Trimethoprim, on
Growth, Macromolecular Synthesis, and Incorporation
of Exogenous Thymine in Escherichia coli.
J. Bacteriol., 110, 905 - 916 (1972)
30. DARRELL, J. H., GARROD, L. P., and WATERWORTH, P. M.:
Trimethoprim: Laboratory and clinical studies.
J. Clin. Path., 21, 202 (1968)

31. DATTA, N.:
Transmissible drug resistance in an epidemic strain
of *Salmonella typhimurium*.
J. Hyg., Camb., 60, 301 (1962)
32. DATTA, N., and HEDGES, R. W.:
Trimethoprim resistance conferred by W plasmids in
Enterobacteriaceae.
J. gen. Microbiol., 72, 349 - 355 (1972)
33. DATTA, N., and HEDGES, R. W.:
Compatibility groups among f^- R-factors.
Nature, London, 234, 222 - 223 (1971)
34. DAVIES, J. E., and ROWND, R.:
Transmissible Multiple Drug Resistance in
Enterobacteriaceae.
Science, 16, (19. May 1972)
35. DAVIES, B. D., and MAAS, W. K.:

Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 38, 755 (1952)
36. DOMAGK, G.:

Dtsch. med. Wschr., 61, 250 (1935a)
Ibid., 61, 829 (1935b)
37. DORNBUSCH, K.:
Regression line analysis to the synergistic effect
for the combination of trimethoprim-sulfamethoxazole.
Chemotherapy, 16, 229 - 238 (1971)
38. DREW, C. D., HUGHES, D. T. D., FOWLE, A. S. E., and
CASSELL, M. A.:
"Effektive Treatment of Chronic Bronchitis with Short
Term Trimethoprim and Sulfamethoxazole", in Spitzy, K. H.,
and Haschek, H., loc. cit., 1/1 (A1 - 5a/3):
293 (1967a)

39. EHRLICH, P.:
Chemotherapeutische Trypanosomen Studien.
Ber. Klin. Wschr., 44, 233 - 236 (1907)
40. ERICSSON, H. M., and SHERRIS, J. C.:
Antibiotic Sensivity Testing. Report of an International Collaborative Study.
Acta path. microbiol. scand. Suppl., 217, 1971
41. EYLES, D. E., and COLEMAN, N.:
Synergistic effect of sulfadiazine and Daraprim against experimental toxoplasmosis in the mouse.
Antibiotics Chemother., 3, 483 - 490 (1953)
42. FALCO, E. A., DU BREUIL, S., and HITCHINGS, G. H.:
2,4-diaminopyrimidines as antimalarials II. 5-benzyl derivatives.
J. Am. chem. Soc., 73, 3758 (1951)
43. FALKOW, S., CITARELLA, R. V., WOHLHIETER, J. A., and WATANABE, T.:
The molecular nature of R-factors.
Bact. Proc., p 14 (1965) and
J. Mol. Biol., 17, 102 (1966)
44. FLEMING, A.:

Brit. J. exp. Path., 10, 226 (1929)
45. FLEMING, M. P., DATTA, N., and GREENBERG,
Trimethoprim-resistance determined by R-factors.
Br. Med. J., 1, 726 - 728 (18. März 1972)
46. FLEMING, M. P.:
Trimethoprim resistance and its transferability in E. coli, isolated from calves, treated with trimethoprim-sulphadiazine: a two year study.
J. Hyg., Camb., 71, 699 - 777 (1973)

47. CHAIN, E., FLOREY, H. W., GARDENER, A. D., HEATLEY, N. G., JENNINGS, M. A., ORR-EWING, J., and SANDERS, A. G.:

Lancet, 226 (Aug. 1940)

48. FRANKE, E., and ROEHL, W.:

Quoted by Ehrlich, P., 1907

49. FREDERICQ, P.:

Colicines et colicinogène.

Ann. Inst. Past., 107, 7 (1964)

50. FRENKEL, J. K., and HITCHINGS, G. H.:

Relative reversal by vitamines (p-aminobenzoic, folic, and folinic acids) of the effects of sulfadiazine and pyrimethamine on toxoplasma, mouse and man.

Antibiotics Chemother., 7, 630 - 638 (1957)

51. FRITSCHÉ, D.:

Hahnenklee-Symposium 25. - 26. Mai 1973.

Editiones Roche

52. FOWLE, A. S. E.:

Trimethoprim.

Br. med. J., 2, 557 (1968)

53. GALLIEN, R., and SCHÖNFELD, H.:

Methods for testing bacterial resistance to active substance combinations using trimethoprim and sulfamethoxazole as an example.

Arzneimittel-Forsch., 21, 577 (1971)

54. GALLIEN, R.:

Hahnenklee-Symposium 25. - 26. Mai 1973.

Editiones Roche

55. GALLIEN, R.:
Antibacterial Action of Trimethoprim-Sulfamethoxazole.
J. Infect. Dis., (Chicago), 28, 486 - 497 (Nov. 1973)
56. GANCZARSKI, A., AUGUSTYNIAK, B., KLOCZKOWSKI, K.,
PRELICH, A., and STAPOR, K.:
Synergism of trimethoprim and sulfamethoxazole action
on microorganism isolated from persons with urinary
tract infections.
Med. Dosw. Microbiol., 24, 307 - 314 (1972)
57. GARROD, L. P., and WATERWORTH, P. M.:
The antibacterial action of Trimethoprim.
Proc. 5th. Int. Congr. of Chemotherapy, Vienna 1967
Ed. K. H. Spitzzy and H. Haschek. Vol. I/2
58. GUTKOWSKA, J., ZALEWSKI, T. ZMUDZKA, B.:
Septrin. Sensivity of pathogenetic bacteria to Septrin.
Pol. Tyg. Lek., 28, 1608 - 1610 (1973)
59. HAHN, F. E., and CIAK, J.:
Elimination of bacterial episomes by DNA complexing
compounds.
Bacterial Plasmids and Antibiotic Resistance,
Springer Verlag, 297 - 306 (1972)
60. HANUS, F. J., SANDS, J. G., and BENETT, E. O.:
Antibiotic Activity in the Presence of Agar.
Appl. Microbiol., 15, 31 - 34 (1967)
61. HAYES, W.:
The genetics of bacteria and their Viruses.
Oxford: Blackwell Publ., (1964)
62. HEDGES, R. W., DATTA, N., and FLEMING, M.P.:
R-factors conferring resistance to trimethoprim
but not sulfonamides.
J. gen. Microbiol., 72, 573 - 575 (1972)

63. HEDGES, R. W., and DATTA, N.:
Plasmids Determining I Pili Constitute a Compatibility Complex.
J. gen. Microbiol., 77, 19 (4. Jan. 1973)
64. HIROTA, Y., and IIJIMA, T.:
Acriflavine as an effective agent for eliminating F-factor in E. coli.
Nature, 180, 655 (1957)
65. HITCHINGS, G. H., ELION, G. B., VANDERWERFF, H., and FALCO, E. A.:
Pyrimidine derivatives as antagonists of pteroyl-glutamic acid.
J. biol. Chem., 174, 765 - 766 (1948)
66. HITCHINGS, G. H.:
Pyrimethamine. The use of an antimetabolite in the chemotherapy of malaria and other infections.
Clin. Pharmac. Ther., 1, 570 - 589 (1960)
67. HITCHINGS, G. H.:
A biochemical approach to chemotherapy.
Trans. N. Y. Acad. Sci., 23, 700 - 708 (1961)
68. HITCHINGS, G. H.:
The utilization of biochemical differences between host and parasite as a basis for chemotherapy.
Biological Council Symposium on Drugs, Parasites and Hosts, ed.
Goodwin, L. G. and Nimmo-Smith, R. H., 196 - 210 (1962)
69. HITCHINGS, G. H., and BURCHALL, J. J.:
Inhibition of folate biosynthesis and function as a basis for Advances in Enzymology, ed.
Nord, F. F., vol. 417 - 468, New York: John Wiley and sons, Inc. Interscience Publishers Div. (1965)

70. HITCHINGS, G. H., and BUSHBY, S. R. M.:
5-benzyl-2,4-diamino-pyrimidines, a new class of
systemic antibacterial agents.
5th. Int. Congr. Biochem., Moscow, 165 (1965)
71. HITCHINGS, G. H., BURCHALL, J. J., and FERONE, R.:
The comparative enzymology of dihydrofolate reductase
and the design of chemotherapeutic agents. Symposia
of the Society for General Microbiology.
Biochemical Studies of Antimicrobial Drugs,
p 294 - 300 (1966a)
72. HITCHINGS, G. H., BURCHALL, J. J., and FERONE, R.:
Comparative enzymology of dihydrofolate reductases
as a basis on chemotherapy.
Proc. III rd. Int. Pharmac. Congr. Sao Paulo, Brazil,
Abstracts 113 (July 24 - 30, 1966b)
73. HITCHINGS, G. H.:
Trimethoprim: Biochemical Basis for Sulphonamide
potentiation.
S. Afr. Med. J., 44, 1 - 2 (15. Aug. 1970)
74. HITCHINGS, G. H.:
Mechanism of action of trimethoprim-sulfamethoxazole.
J. Infect. Dis. (Chicago), 128, 433 - 436 (Nov. 1973)
75. HUNTER, I. J.:
In vitro sensivity of 368 urnary organisms to
trimethoprim-sulfamethoxazole and other antibacterials.
Med. J. Aust., 2, 317 - 321 (15. Aug. 1970)
76. JAKOB, F., and WOLLMAN, E. L.:
Sexuality and the genetics of bacteria.
Acad. Press, New York (1961)
77. KEEFER, C. S., and WEINSTEIN, L.:
In "Principles and Practise of Antibiotic Therapie".
Medical Encyclopedia Inc., New York, p. 453 (1954)

78. KAUFMANN, F.:
Enterobacteriaceae.
Munksgaard, Kopenhagen, p. 360 (1954)
79. KAUFMANN, F.:
The bacteriology of Enterobacteriaceae.
Munksgaard, Kopenhagen/Dänemark (1966)
80. KAYSER, F. H., FELIX, M., and WÜST, J.:
Extrachromosomal drug resistance in Methicillin
resistant *S. aureus*.
Bacterial Plasmids and Antibiotic-resistance,
Springer Verlag, 371 - 380 (1972)
81. KOCH, A. E., and BURCHALL, J. J.:
Reversal of antimicrobial activity of trimethoprim
by thymidine in commercially prepared media.
Appl. Microbiol., 22, 832 (1971)
82. KOHN, H. J., and HARRIS, J. S.:
On the mode of action of sulfonamides.
I. Action on *E. coli*.
J. Pharmacol. exp. Ther., 73, 343 - 361 (1941)
83. KNOTHE, H.:
Hahnenklee-Symposium 25. - 26. Mai 1973.
Editiones Roche
84. LACEY, R. W., BRUTEN, D. M., GILLESPIE, W. A.,
and LEWIS, E. L.:
Trimethoprim-resistant Coliforms.
Lancet, 1, 409 (1972)
85. LACEY, R. W., and LEWIS, E. L.:
Is Co-trimoxazole Bactericidal in Sputum?
Br. med. J., 4, 165 (20. Okt. 1973)

86. LACEY, R. W., and LEWIS, E. L.:
Co-Trimoxazole Resistance.
Dr. med. J., 1, 328 (23. Febr. 1974)
87. LAWN, A. M., MEYNELL, E., MEYNELL, G. G.; and
DATTA, N.:
Sexpili and the classification of sex factors
in the Enterobacteriaceae.
Nature, London, 216, 343 - 346 (1967)
88. LEDERBERG, J., and LEDERBERG, E. M.:
Replica plating and indirect selection on bacterial
mutants.
J. Bacteriol., 63, 399 (1952)
89. LEDERBERG, J., CAVALLI, L. L., LEDERBERG, E. M.:
Sex compability in *Escherichia coli*.
Genetics, 37, 720 (1952)
90. LEBEK, G.:
Übertragung der Mehrfachresistenz gegen Antibiotika
und Chemotherapeutika von *E. coli* auf andere Spezies
gramnegativer Bakterien.
Zbl. Bakt. I Abt. Orig., 189, 213 (1963)
91. LEBEK, G.:
Die infektiöse, bakterielle Antibiotikaresistenz.
Verlag Hans Huber, Bern, Stuttgart (1969)
92. LEBEK, G., and WIEDEMER
In vitro sensivity of human pathogens to the drug
combination sulfamethoxazole-trimethoprim.
Schweiz. Med. Wschr. (Basel), 101, 1385 - 1390
(25. Sept. 1971)
93. LEBEK, G.:
Extrachromosomale, Übertragbare Antibiotikaresistenz
bei Krankheitserregern des Menschen.
Hippokrates, 43, 45 - 60 (1972)

94. LEGLER, F.:
Laboratory findings on a combination of
trimethoprim and sulfamethoxazole.
Deutsch. Med. Wschr. (Stuttgart), 96, 823 passim. (1971)
95. LEPECQ, J. B., and PAOLETTI, G.:
A fluorescent complex between ethidium bromide
and nucleic acids.
J. molec. Biol., 27, 106 (1967)
96. LEWIS, E. L., and LACEY, R. W.:
Present significance of resistance to trimethoprim
and sulphonamides in coliforms, *Staphylococcus aureus*,
and *Streptococcus faecalis*.
J. Clin. Path., 26, 175 - 180 (1973)
97. LINZENMEIER, G.:
Hahnenklee-Symposium 25. - 26. Mai 1973.
Editiones Roche
98. LURIA, S. E., and DELBRÜCK, M.:
Mutations of bacteria from virus sensitivity to
virus resistance.
Genetics, 28, 491 (1943)
99. LUX, R. E.:
The chemotherapy of *Eimeria tenella*
1. Diaminopyrimidines and dihydralazines.
Antibiotics Chemother., 4, 971 - 977
100. MARIANI, P. L., CERUTI, T., and BIAZZI, E.:
In vitro activity of Eusaprim.
Min. Med. (Torino), 64, 1835 - 1838 (16. May 1973)
101. MARGET, W.:
Hahnenklee-Symposium 25. - 26. Mai 1973.
Editiones Roche

102. MATSUYAMA, T., HARADA, K., SUZUKI, M., KAMEDA, M.,
and KOMYAMA, S.:
An epidemic of dysentery caused by *Shigella flexneri*
3a highly resistant to common antibiotics and con-
sideration of mechanism of development of drug
resistance.
Nippon Ijii Shimpo, 22, 1795 (1959)
103. MAY, J. R., and DAVIES, J.:
Resistance of *Haemophilus influenzae* to Trimethoprim.
Br. med. J., 3, 376 - 377 (12. Aug. 1972)
104. MEYER-ROHN, J., and LIEHR, W.:
Zur Resistenzentwicklung von Bakterien gegen
Trimethoprim-Sulfamethoxazole (Eusaprim).
Fortschr. d. Med. (Würzburg), 92, 121 - 126 (24. Jan. 1974)
105. MEYNELL, E., and DATTA, N.:
Functional homology of sex-factors and resistance
transfer factors.
Nature, 207, 884 (1965)
106. MEYNELL, G. G., and LAWN, A. M.:
Filamentous phages specific for the I sex factor.
Nature, London, 217, 1184 - 1186 (1968)
107. MEYNELL, G. G.:
Bacterial Plasmids.
Published by The Macmillan Press Ltd. (1972)
108. MILLER, G. H., DOUKAS, P. H., and SEYDEL, J. K.:
Sulfonamide structure-activity relationships in
cell-free system. Correlation of inhibition of folate
synthesis with antibacterial activity and physico-
chemical parameters.
J. Med. Chem., 15, 700 (1972)

109. MITSUHASHI, S., HARADA, K., KAMEDA, M., SUZUKI, M.,
and EGAWA E.:
On the drug-resistance of enteric bacteria. 3. Trans-
mission of the drug resistance from Shigella to F⁻
or Hfr strains of E. coli K₁₂.
Jap. J. exp. Med., 30, 301 (1960)
110. MITSUHASHI, S., HARADA, K., and KAMEDA, M.:
On the drug resistance of enteric bacteria (6): spon-
taneous and artificial elimination of transmissible
drug resistance factors.
Jap. J. exp. Med., 31, 119 (1961)
111. MITSUHASHI, S., KONO, M., and HARADA, K.:
Inactivation of Chloramphenicol by extrachromosomal
genetic determinants.
V. Int. Kongreß f. Chemother., Wien 1967, C 2/9, p 1201
112. MITSUHASHI, S.:
Transferable Drug Resistance Factor R.
University Park Press 1971
113. MIOVIC, M., and PIZER, L. J.:
Effect of Trimethoprim on macromolecular synthesis
in E. coli.
J. Bact., 106, 856 - 862 (1971)
114. MORZARIA, R. N., WALTON, J. G., and PICKERING, D.:
Neonatal Meningitis Treated with Trimethoprim and
Sulfamethoxazole.
Br. med. J., 2, 1101 (1969)
115. NAKHLA, L. S.:
Resistance of Staphylococcus aureus to sulphametho-
xazole and trimethoprim.
J. Clin. Path., 25, 708 - 712 (1972)

116. NAKHLA, L. S.:
Genetic determinants of trimethoprim resistance in a strain of *Staphylococcus aureus*.
J. Clin. Path. 26, 712 - 715 (1973)
117. NOALL, E. P. W., SEWARDS, H. F. G., and WATERWORTH, P.M.:
Successful Treatment of a case of *Proteus* septicaemia.
Br. med. J., 2, 511 (1962)
118. NOWICKI, L., MARTIN, H., and BUCHKREMER, G.:
Untersuchungen über Forminoglutaminsäure Ausscheidung im Urin unter der Behandlung mit Trimethoprim sowie mit Trimethoprim und einem Sulfonamid.
Chemotherapy, 14, 71 - 83 (1969)
119. PATO, M. L., and BROWN, G. M.:
Mechanism of Resistance of *Escherichia Coli* to Sulfonamides.
Arch. Biochem. Biophysic., 103, 443 (22. July 1963)
120. PINNEY, R. J., and SMITH, J. T.:
Joint Trimethoprim and Sulphamethoxazole Resistance in Bacteria infected with R-factors.
J. med. Microbiol., 6, 13 - 19 (1973)
121. PINNEY, R. J., and SMITH, J. T.:
Elimination of an R-factor by Trimethoprim.
J. Pharm. Pharmacol., 24, 126 (1972)
122. RAUTER, G.:
Das Wirkungsspektrum von Trimethoprim und Sulfa-methoxazol (Eusaprim) in vitro im Vergleich zu den üblichen Antibiotika.
"Der praktische Arzt", Österreich. Mschr. f. Allg.Med., 289, 758 - 776 (Juni 1971)

123. RITZERFELD, W.:
Development of resistance and its suppression under
the influence of various penicillins.
Bacterial Plasmids and Antibiotic-resistance,
Springer-Verlag, 123 - 129 (1972)
124. RITZERFELD, W.:
Resistenzsituation der Erreger von Harnwegsinfek-
tionen im Jahre 1971.
Deutsch. Med.J., 23, 4 (1972)
125. ROBERTSON, M. H.:
Nalidix acid in urinary tract infections.
Med. J. Aust., 1, 940 (1969)
126. ROWND, R., NAKAYA, R., and NAKAMURA, A.:
Molecular nature of the drug-resistance factors of
the Enterobacteriaceae.
J. Mol. Biol., 17, 376 (1966)
127. SEYDEL, J. K., WEMPE, E., MILLER, G. H., and
MILLER, L.:
Kinetics and Mechanisms of Action of Trimethoprim
and Sulfonamides, Alone or in Combination, upon
Escherichia coli.
Chemotherapy, 17, 217 - 258 (1972)
128. SEYDEL, J. K.:
Hahnenklee-Symposium 25. - 26. Mai 1973.
Editiones Roche
129. SIMMONS, N. A.:
Colistin, sulfamethoxazole, and trimethoprim in
synergy against Gram negative bacteria.
J. Clin. Path., 23, 757 (1970)

130. SIVE, J., GREEN, R., and METZ, J.:
Effect of trimethoprim on folate-dependent DNA
synthesis in human bone marrow.
J. Clin. Path., 25, 194 (1972)
131. SOURANDER, L. B., and WERNER, G. E.:
"Efficiency and tolerance of sulphonamide-trimethoprim
combinations in geriatric patients with bacteriuria",
in Spitzzy, K. H. and Haschek, H., loc. cit.,
5/1 & 199 (1967)
132. STILLE, W.:
Hahnenklee-Symposium 25. - 26. Mai 1973.
Editiones Roche
132. TAUCHNITZ, C., and TATTERMANN:
Sensibilitätsprüfungen gegenüber Trimethoprim-
Sulfamethoxazol.
Zschr. inn. Med. (Leipzig), 27, 390 - 395 (1. Mai 1972)
134. THOMAS, M., and DZIEJKO, M.:
Co-trimoxazole Resistance.
Br. med. J., 1, 328 (1974)
135. THEN, R., and ANGEHRN, P.:
Co-trimoxazole Resistance.
Br. med. J., 1, 78 - 79 (1974)
136. TIESLER, E.:
Effectivity of a sulfonamide-trimethoprim combination
against various gram-negative rods and gram-positive
cocci in the agar diffusion test.
Med. Klin., 65, 1825 - 1828 (1970)
137. WATANABE, T., and FUKASAWA, T.:
Episome-mediated transfer of drug resistance in
Enterobacteriaceae II. Elimination of resistance
factors by acridine dyes.
J. Bact., 81, 679 (1961)

138. WATERWORTH, P. M.:

Practical aspects of testing sensitivity to
trimethoprim and sulfonamide.

Postgrad. Med. J., 45, 21 - 29 (1969)

139. WELLCOME G.m.b.H.:

Eusaprim

Unterlagen für die klinische Prüfung.

London (1968)

140. WELLCOME, ENGLAND.:

Septrin

Information for Investigators.

London (1969)

Für die Überlassung von Thema und Arbeitsplatz,
sowie wegen seiner steten Hilfsbereitschaft und
Anleitung zur experimentellen Arbeit gilt Herrn
Professor Dr. W. Mannheim mein besonderer Dank.

L E B E N S L A U F

Am 3. März 1947 wurde ich als zweiter Sohn des Ingenieurs Karl-Heinz Gensch und dessen Ehefrau Marianne, geb. Schneider, in Bad Sooden Allendorf, Kreis Witzenhausen, geboren.

Von 1953 bis 1958 war ich Schüler der Bürgerschule 13 in Kassel; im Anschluß daran besuchte ich bis zum Abitur, im November 1966, die Albert-Schweitzer Schule in Kassel.

Danach begann ich zunächst an der TH-Darmstadt ein Studium der Elektrotechnik und immatrikulierte mich 1968 für ein Semester in die Wirtschaftswissenschaftliche Fakultät der Universität Gießen.

Nach bestandener Wechslerprüfung begann ich 1969 an der Universität Marburg mit dem Studium der Medizin, an der ich 1971 die ärztliche Vorprüfung und 1974 das medizinische Staatsexamen ablegte.

Während meiner Medizinalassistentenzeit habe ich an der Medizinischen Klinik der Universität Marburg und im Kreiskrankenhaus Frankenberg/Eder gearbeitet. Seit August 1975 bin ich als Medizinalassistent an der Dermatologischen Klinik der Universität Marburg tätig.

Mit der vorliegenden Arbeit habe ich 1971 begonnen und den experimentellen Teil vor der Meldung zum Staatsexamen abgeschlossen.

Seit 1971 bin ich mit der Lehrerin Ursula, geb. Boll verheiratet, mit der ich seit November 1974 eine Tochter habe.

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Herren Professoren und Dozenten:

Amon, Aurich, Bock, Bommer, Brasch, Brück,
Buchholz, Daume, Dimroth, Dölle, Duven, Eißner,
Exner, Friederich, Ganz, Gerdes, Golenhofen,
Graul, Hamelmann, Hamm, Havemann, Hardewig,
Hensel, Hess, Heuser, Hildebrandt, Hilgermann,
Hohorst, Hort, Jakob, Karlson, Keil, Klaus,
Kleinsasser, Knauf, Koecke, Koransky, Kühnel,
Lange, Linneweh, Mannheim, Martini, Neswetha,
Nultsch, Petry, Pots, Reim, Riecken, Rodeck,
Rohen, Sekeris, Seydel, Siegert, Schleyer,
Schmid, Schmitz-Moormann, Solcher, Straub,
Stutte, Thoenes, Uhlarik, Walcher, Willenbockel.

